

17.11.2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 13 JAN 2005

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 1 月 1 7 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 3 8 7 2 5 5
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 3 8 7 2 5 5]

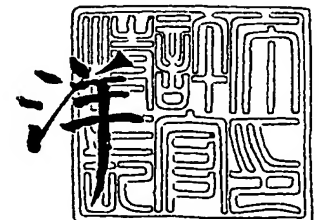
出 願 人 エーザイ株式会社
Applicant(s):

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 2 月 2 2 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 P03-0162
【提出日】 平成15年11月17日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 15/00
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県つくば市上広岡 4 7 2 - 1
 【氏名】 吉永 貴志
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県つくば市二の宮 1 - 1 8 - 2 6
 【氏名】 新井 徹
【特許出願人】
 【識別番号】 000000217
 【氏名又は名称】 エーザイ株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100092783
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 小林 浩
 【電話番号】 03-3273-2611
【選任した代理人】
 【識別番号】 100095360
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 片山 英二
【選任した代理人】
 【識別番号】 100093676
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 小林 純子
【選任した代理人】
 【識別番号】 100120134
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 大森 規雄
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 157061
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いたパッチクランプ法により測定されるhERG電流が0.6 nA以上のチャネルを発現することができる細胞を、hERG遺伝子が導入された細胞全体の40%以上含む、hERGチャネル発現細胞集団。

【請求項 2】

hERG遺伝子の導入がウイルスベクターによるものである請求項1記載の細胞集団。

【請求項 3】

ウイルスベクターがレトロウイルスベクター又はレンチウイルスベクターである請求項2記載の細胞集団。

【請求項 4】

hERG電流の細胞全体の平均が0.3 nA以上である請求項1から3のいずれか1項に記載の細胞集団。

【請求項 5】

全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いたパッチクランプ法により測定されるhERG電流が1.0 nA以上のhERGチャネルを発現することができる細胞。

【請求項 6】

hERG遺伝子の導入がウイルスベクターによるものである請求項5記載の細胞。

【請求項 7】

ウイルスベクターがレトロウイルスベクター又はレンチウイルスベクターである請求項6記載の細胞。

【請求項 8】

ウイルスベクターを用いてhERGチャネルを発現させることを特徴とする、請求項1記載の細胞集団または請求項5記載の細胞を作製する方法。

【請求項 9】

ウイルスベクターがレトロウイルスベクター又はレンチウイルスベクターである請求項8記載の作製方法。

【請求項 10】

ウイルスベクターがレトロウイルスベクターである請求項8記載の作製方法。

【請求項 11】

ウイルスベクターを超速心により濃縮する工程を含むことを特徴とする、請求項8から10のいずれか1項に記載の作製方法。

【請求項 12】

請求項1から4のいずれか1項に記載の細胞集団または請求項5から7のいずれか1項に記載の細胞を用いることを特徴とする、hERG電流の阻害活性を測定する方法。

【請求項 13】

全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いることを特徴とする請求項12記載の方法。

【請求項 14】

請求項8から11のいずれか1項に記載の方法により作製された細胞集団または細胞を用いることを特徴とする、hERG電流の阻害活性を測定する方法。

【請求項 15】

全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いることを特徴とする請求項14記載の方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】hERGチャネル発現細胞

【技術分野】

【0001】

本発明は安全性の面において薬剤研究開発時に大きな問題となっている心電図QT間隔延長による心臓への副作用のリスクを回避するための評価細胞とその細胞樹立法およびそれらによる薬物の評価に関するものである。

【背景技術】

【0002】

安全性薬理試験は、新規医薬品のヒトに対する安全性を薬理的観点から検討する非臨床試験である。被験物質のヒトに対する安全性の検討と副作用予測などを目的とした安全性薬理試験ガイドラインが日米EU医薬品規制調和国際会議（ICH）において制定されており、そのガイドラインによれば、安全性薬理試験の一環として、被験物質の催不整脈作用、特に心電図QT間隔延長作用の有無を検討することが求められている。薬物の投与によって引き起こされるQT間隔延長に伴う、心室性頻脈、torsades de pointes、及び致死的な不整脈から患者を保護するために、このような重篤な副作用を誘発する可能性を有するQT間隔延長作用を検出することは、医薬品開発において非常に重要である。

これまでに、QT間隔延長作用を有する多くの医薬品は、心筋細胞遅延型整流カリウムチャネルを抑制することが知られており、hERG (human ether-a-go-go related gene) チャネルがそのチャネルの主たる構成タンパクとして機能していると考えられている。従って、ヒト用医薬品による心室再分極遅延（QT間隔延長）の潜在的可能性を評価するためのガイドライン(ICH-S7B)案では、非臨床試験としてhERGチャネルを導入した細胞を用いたイオンチャネルアッセイが推奨されている。

【0003】

従来、hERGチャネルに対する化合物の作用を適切に評価する方法として、hERGチャネルを発現させた細胞又はhERGチャネルを本来保持している心筋細胞に対して直接ガラス微小電極を用いてチャネル活性を記録するパッチクランプ法（非特許文献1）が用いられてきた。しかし、このパッチクランプ法は、高い精度でhERGチャネルに対する薬物の評価を適切に行えるものであるが、熟練した高度な技術を必要とするものであり、その処理能力は著しく低く（1-5化合物/日/人）、薬剤開発段階での数多くの薬剤候補化合物に対して処理能力が著しく不足しているという問題があった。

【0004】

一方、hERGチャネルの評価の処理能力を高める方法として、放射性同位元素である Rb^{3+} の放出を検出する方法（非特許文献2）、放射性同位元素であるトリチウム（ 3H ）で標識したdofetilideの結合との競合により評価する方法（非特許文献3）、および膜電位感受性色素を利用した方法（非特許文献4および5）などが報告されている。しかし、これらの方法は、放射性物質を用いる点で操作が煩雑であり、また、間接的な検出方法であるために感度および精度が低くなることから、パッチクランプ法で得られるhERGチャネル阻害活性の測定精度と大きく乖離していた。

【0005】

近年、上記問題点を解決する手段としてhERGチャネルによる影響を適切に評価しつつ処理能力の高い機器である全自動ハイスループットパッチクランプシステムが開発されており、その中のいくつかの機器（IonWorks HTTM; Molecular Device社、PatchXpressTM 7000 A; Axon Instruments社）が発売されている。これらの装置は、hERGチャネルを発現した細胞を浮遊状として、重力による落下および陰圧によって、各ウェルの中央にある小径の穴へ細胞を吸引し、電流記録可能な状態にするものであるため、パッチクランプ法のように熟練した高度な技術を必要としない。また、化合物の処理能力も非常に高く、1日に3000ポイント以上のデータを取得することができる。ただし、この装置を用いて評価するに当たっては、実験に用いるhERGチャネル発現細胞が非常に重要になる。すなわち、古典的なパッチクランプ法による測定では、細胞1つ1つを選択して評価するため、hERGチャネルの

発現量の高い細胞を選び出して測定することができるのに対し、全自動ハイスループットパッチクランプシステムによる測定では、存在する細胞をランダムに使用するために発現量の高い細胞を選ぶことができない。従って、全自動ハイスループットパッチクランプシステムにより多検体を正確に評価するためには、一定割合以上の細胞がhERGチャネルを発現していること、かつ、その発現量も十分に多いことが求められる。そこで、この全自動ハイスループットパッチクランプシステムで使用するhERGチャネル発現細胞を作製するために、種々の試みがなされている。

【0006】

これまでの報告では、ある細胞にリン酸カルシウム法やリポフェクション法を用いたトランスフェクションによりhERG遺伝子を細胞に導入し、限界希釈によるクローニング及びhERG遺伝子導入量確認、あるいはhERGチャネルによる電流測定等の著しく労働消費的な手順を経て安定発現細胞を得ていた（非特許文献6および7）。しかしながら、限界希釈によるクローニングという大変な労力を割いても、これらの手法ではhERG遺伝子導入量が充分でないため、細胞あたりのhERG電流は微弱なものとなる。hERG電流が小さい場合には、十分なS/N比を取ることができず、その分測定感度は低下することになる。また、クローニングによりいかにhERG電流の大きな細胞を取得しても、そのhERG電流の大きさには限界があるため、全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いても高感度の測定が困難であることが多い。

【0007】

また、hERGチャネルが分類されるイオンチャネルの測定では、細胞が内在的にもつイオンチャネルの影響が細胞種毎に異なるために、細胞種を変えることで測定実用度が大きく影響を受けることが多く、そのために、別種の細胞で測定を行う際にも上記と同様の労働消費的な操作を繰り返す必要があった。

【非特許文献1】Neher, E. and Sakmann, B. Nature vol 260, 779-802, (1976)

【非特許文献2】Cheng, C.S. et al. Drug Dev. Ind. Pharm. vol.28, 177-191, (2002)

【非特許文献3】Finlayson, K. et al. Eur. J. Pharm. vol.430, 147-148 (2001)

【非特許文献4】Tang, W. et al. J.Biomol.Screen vol.6, 325-331 (2001)

【非特許文献5】Baxter, D. F. et al. ibid. vol.7, 79-85 (2003)

【非特許文献6】Tang, W. et al. J.Biomol.Screen. vol.6 325-331 (2001)

【非特許文献7】Assay and Drug Development Technologies. 1(2-3), 127-135, 2003.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、薬剤研究開発におけるhERGチャネル阻害に基づく副作用を予測するための発現レベルの著しく高いhERGチャネル発現細胞の樹立法を確立し、それにより、高感度かつ高処理能力を有する被験物質評価法を確立するものである。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、上記課題を解決するため、鋭意検討を重ねた結果、hERG遺伝子をレトロウイルスベクタープラスミド又はレンチウイルスベクタープラスミドに挿入し、ウイルスベクターを調製後、必要に応じて超遠心による濃縮を行い、細胞にhERG遺伝子を導入することにより、hERGチャネルを高発現する細胞を得ることに成功した。また、この細胞は、全自動ハイスループットパッチクランプシステム又は色素を用いた測定法において有効な発現量を確保し得るものであることを見出し、本発明を完成させた。

【0010】

すなわち本発明は、以下に関する。

(1) 全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いたパッチクランプ法によ

り測定されるhERG電流が0.6 nA以上のチャネルを発現することができる細胞を、hERG遺伝子が導入された細胞全体の40%以上含むhERGチャネル発現細胞集団。

(2) hERG遺伝子の導入がウイルスベクターによるものである(1)記載の細胞集団。

【0011】

(3) ウイルスベクターがレトロウイルスベクター又はレンチウイルスベクターである(2)記載の細胞集団。

(4) hERG電流の細胞全体の平均が0.3 nA以上である(1)から(3)のいずれか1項に記載の細胞集団。

【0012】

(5) 全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いたパッチクランプ法により測定されるhERG電流が1.0 nA以上のhERGチャネルを発現することができる細胞。

(6) hERG遺伝子の導入がウイルスベクターによるものである(5)記載の細胞。

(7) ウイルスベクターがレトロウイルスベクター又はレンチウイルスベクターである(6)記載の細胞。

【0013】

(8) ウイルスベクターを用いてhERGチャネルを発現させることを特徴とする、(1)から(4)のいずれか1項に記載の細胞集団または(5)から(7)のいずれか1項に記載の細胞を作製する方法。

(9) ウイルスベクターがレトロウイルスベクター又はレンチウイルスベクターである(8)記載の方法。

【0014】

(10) ウイルスベクターがレトロウイルスベクターである(8)記載の方法。

【0015】

(11) ウイルスベクターを超遠心により濃縮する工程を含むことを特徴とする、(8)から(10)のいずれか1項に記載の方法。

【0016】

(12) (1)から(4)のいずれか1項に記載の細胞集団または(5)から(7)のいずれか1項に記載の細胞を用いることを特徴とする、hERG電流の阻害活性を測定する方法。

【0017】

(13) 全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いることを特徴とする(12)記載の方法。

【0018】

(14) (8)から(11)のいずれか1項に記載の方法により作製された細胞集団または細胞を用いることを特徴とする、hERG電流の阻害活性を測定する方法。

【0019】

(15) 全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いることを特徴とする(14)記載の方法。

【発明の効果】

【0020】

本発明により、薬剤研究開発におけるhERGチャネル阻害に基づく副作用を予測するための発現レベルの著しく高いhERGチャネル発現細胞の樹立法を確立し、それにより高感度で処理能力の高い評価を可能とした。

【0021】

本発明により、同時に効率よくhERGチャネルの高発現細胞を得られることを利用して、多様な細胞種に対してhERGチャネルを高レベルで発現させることにより、各細胞種間で内在性のイオンチャネルの影響を比較することで、薬剤研究開発における副作用予測を行う上で最も適切な細胞種を選択することを可能としている。

【発明を実施するための最良の形態】

【0022】

以下に本発明の実施の形態について説明する。以下の実施の形態は、本発明を説明するための例示であり、本発明をこの実施の形態にのみ限定する趣旨ではない。本発明は、その要旨を逸脱しない限り、さまざまな形態で実施をすることができる。

【0023】

本発明において、パッチクランプ法とは、細胞膜上に存在するイオンチャネルを通過するイオンの流れを高感度で検出する手法である（新パッチクランプ実験技術法、岡田泰伸編、吉岡書店）。また、本発明において古典的なパッチクランプ法とは、高度な技術を要する研究員が、顕微鏡観察下で、直径0.5~3 μ mのガラス微小電極を細胞に押し当てて、非常に高い抵抗状態を作り上げた後にそのパッチを破壊することで、細胞膜表面上に存在するイオンチャネルを流れる電流を記録するホールセルパッチクランプ法である。

【0024】

本発明において、全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いたパッチクランプ法とは、細胞をPBS等に浮遊状態で測定装置にセットし、アンフォテリシンB等を用いて細胞膜表面に穿孔を形成させ、細胞表面に存在するイオンチャネルを通して流れるイオンの動きを電流として検出する穿孔ホールセルパッチクランプ法である。

【0025】

本発明において、全自動ハイスループットパッチクランプシステムとは、浮遊状にした細胞を、重力による落下および陰圧によって、各ウェルの小径の穴へ吸引し、電流記録を可能とする装置をいう。全自動ハイスループットパッチクランプシステムには、例えば、IonWorks HTTM (Molecular Device社)、PatchXpressTM 7000A (Axon Instruments社) があげられる。

【0026】

本発明において、hERGチャネルとは、心筋細胞における遅延整流型カリウムチャネルの構成タンパク質の一つであり、詳細については後述する。

【0027】

本発明において、hERG電流とは、細胞膜表面に存在するhERGチャネルを流れるカリウムイオンの流れのことである。このチャネルは、心臓において、心筋細胞の電気的な興奮を鎮めるために重要な役割を担っている。また、このhERG電流を抑制する薬剤は、重篤な心室性不整脈を誘発する危険性があるということで、市場からの撤退を余儀無くされた。また、新規薬剤の開発において、このhERGチャネルに対する作用がない、もしくは極力弱い薬剤の開発が必須となっている。

【0028】

本発明において、全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いたパッチクランプ法によって測定されるhERG電流とは、hERGチャネルを発現した細胞の膜電位を変化させた時に観察されるイオン電流をいう。より具体的には、細胞の膜電位を-80mVから+20mVへ1秒間、引き続き-50mVに1秒間変化させた時に検出されるイオン電流であり、このhERG電流の大きさとしては、-50mVに変化させた時に観察される末尾電流のピーク値をhERG電流の大きさとする。

【0029】

本発明において、hERGチャネル発現細胞とは、hERGチャネルを発現している細胞をいう。以下にhERGチャネル発現細胞の作製方法を記載する。

【0030】**<hERGチャネル>**

本発明において細胞に発現させるhERGチャネルは、配列番号：2（GenBankアクセシオン番号U04270）で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチド（以下、本発明のポリペプチドと称する場合がある）を含むものである。

【0031】

以下、本発明のポリペプチドについて詳細に説明する。

配列番号：2で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番

号: 2 で表されるアミノ酸配列と約 90% 以上、好ましくは約 95% 以上、より好ましくは約 98% 以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる。

特に、配列番号: 2 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、上記のアミノ酸配列の他、配列番号: 2 で表わされるアミノ酸配列において 1 個又は複数個 (例えば 1 個又は数個) のアミノ酸に欠失、置換又は付加等の変異が生じたアミノ酸配列であって、hERG 活性を有するポリペプチドのアミノ酸配列である。

例えば、(i) 配列番号: 2 で表されるアミノ酸配列中の 1~5 個 (好ましくは 1~3 個、さらに好ましくは 1~2 個、より好ましくは 1 個) のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii) 配列番号: 2 で表されるアミノ酸配列に 1~5 個 (好ましくは 1~3 個、さらに好ましくは 1~2 個、より好ましくは 1 個) のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(iii) 配列番号: 2 で表されるアミノ酸配列に 1~5 個 (好ましくは 1~3 個、さらに好ましくは 1~2 個、より好ましくは 1 個) のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(iv) 配列番号: 2 で表されるアミノ酸配列中の 1~5 個 (好ましくは 1~3 個、さらに好ましくは 1~2 個、より好ましくは 1 個) のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、(v) 上記 (i)~(iv) を組み合わせたアミノ酸配列などがあげられる。

【0032】

1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列からなる変異ポリペプチドであって、元のポリペプチドと同じ生物学的活性が維持されるポリペプチドも、本発明の範囲に含まれる (Mark et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 5662-6; Zoller and Smith (1982) Nucleic Acids Res. 10: 6487-500; Wang et al. (1984) Science 224: 1431-3; Dalbadie-McFarland et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6409-13)。

【0033】

ここで、アミノ酸の置換とは、配列中のアミノ酸残基の一つ以上が、異なる種類のアミノ酸残基に変えられた変異を意味する。このような置換により本発明の hERG 遺伝子によりコードされるアミノ酸配列を改変する場合、蛋白質の機能を保持することが必要な場合には、保存的な置換を行うことが好ましい。保存的な置換とは、置換前のアミノ酸と似た性質のアミノ酸をコードするように配列を変化させることである。アミノ酸の性質は、例えば、非極性アミノ酸 (Ala, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Val)、非荷電性アミノ酸 (Asn, Cys, Gln, Gly, Ser, Thr, Tyr)、酸性アミノ酸 (Asp, Glu)、塩基性アミノ酸 (Arg, His, Lys)、中性アミノ酸 (Ala, Asn, Cys, Gln, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val)、脂肪族アミノ酸 (Ala, Gly)、分枝アミノ酸 (Ile, Leu, Val)、ヒドロキシアミノ酸 (Ser, Thr)、アミド型アミノ酸 (Gln, Asn)、含硫アミノ酸 (Cys, Met)、芳香族アミノ酸 (His, Phe, Trp, Tyr)、複素環式アミノ酸 (His, Trp)、イミノ酸 (Pro, 4Hyp) 等に分類することができる。

従って、非極性アミノ酸同士、あるいは非荷電性アミノ酸同士で置換させることが好ましい。中でも、Ala、Val、Leu 及び Ile の間、Ser 及び Thr の間、Asp 及び Glu の間、Asn 及び Gln の間、Lys 及び Arg の間、Phe 及び Tyr の間の置換は、蛋白質の性質を保持する置換として好ましい。変異されるアミノ酸の数及び部位は特に制限ない。

【0034】

このような配列番号: 2 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドは、『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.』(Cold Spring Harbor Press (1989))、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987-1997); 特に Section 8.1-8.5)、Hashimoto-Goto et al. (1995) Gene 152: 271-5、Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-92、Kramer and Fritz (1987) Method. Enzymol. 154: 350-67、Kunkel (1988) Method. Enzymol. 85: 2763-6 等に記載の部位特異的変異誘発法等の方法に従って調製することができる。

また、ポリヌクレオチドに変異を導入するには、Kunkel 法や Gapped duplex 法等の公知手法により、部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット、例えば QuikChange

TM Site-Directed Mutagenesis Kit (ストラタジーン社製)、GeneTailorTM Site-Directed Mutagenesis System (インビトロジェン社製)、TaKaRa Site-Directed Mutagenesis System (Mutan-K、Mutan-Super Express Km等: タカラバイオ社製) 等を用いて行うことができる。

【0035】

本発明のポリペプチドを構成するアミノ酸残基は天然に存在するものでも、また修飾されたものであっても良い。アミノ酸残基の修飾としては、アシル化、アセチル化、アミド化、アルギニル化、GPIアンカー形成、架橋、 γ -カルボキシル化、環化、共有架橋の形成、グリコシル化、酸化、脂質または脂肪誘導体の共有結合化、ジスルフィド結合の形成、セレノイル化、脱メチル化、蛋白質の分解処理、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合化、ヒドロキシル化、ピログルタメートの形成、フラビンの共有結合化、プレニル化、ヘム部分の共有結合化、ホスファチジルイノシトールの共有結合化、ホルミル化、ミリストイル化、メチル化、ユビキチン化、ヨウ素化、ラセミ化、ADP-リボシル化、硫酸化、リン酸化等が例示される。さらに、本発明のポリペプチドには他のペプチド配列により付加された融合蛋白質を含む。本発明のポリペプチドに付加するペプチド配列としては、インフルエンザ凝集素(HA)、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)、サブスタンスP、多重ヒスチジンタグ(6×His、10×His等)、プロテインC断片、マルトース結合蛋白質(MBP)、免疫グロブリン定常領域断片、 α -チューブリン断片、 β -ガラクトシダーゼ、B-タグ、c-myc断片、E-タグ(モノクローナルファージ上のエピトープ)、FLAG(Hopp et al. (1988) Bio/Technol. 6: 1204-10)、Ickタグ、p18 HIV断片、HSV-タグ(ヒト単純ヘルペスウイルス糖蛋白質)、SV40T抗原断片、T7-タグ(T7 gene10蛋白質)、VSV-GP断片(Vesicular stomatitisウイルス糖蛋白質)等の蛋白質の識別を容易にする配列、組換え技術により蛋白質を発現させる際に安定性を付与する配列等を選択することができる。

【0036】

本発明のポリペプチドとしては、以上のようなポリペプチドがあげられ、例えば、前記の配列番号: 2で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号: 2で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと実質的に同質のhERG活性を有するポリペプチドなどが好ましい。ここで、「hERG活性」とは、カリウムイオンチャネルとして機能する活性を意味する。実質的に同質の活性とは、その活性が性質的に(例、生理化学的に、または薬理学的に)同質であることを示す。

【0037】

<hERG遺伝子>

本発明において、hERG遺伝子とは、hERGチャネルをコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドをいう。本発明のhERG遺伝子は、配列番号: 1 (GenBankアクセッション番号U04270) で表される核酸配列と同一もしくは実質的に同一の核酸配列を有するポリヌクレオチドを含むものである。実質的に同一の核酸配列を有するポリヌクレオチドは、前記本発明のポリペプチドをコードする核酸配列を有するポリヌクレオチドであれば何でもよい。例えば、配列番号: 2で表わされるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドのほか、配列番号: 2で表わされるアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列からなる変異ポリペプチドであって、hERG活性が維持されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも本発明において使用することができる。

【0038】

ここで、「ポリヌクレオチド」とは、複数のデオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)等の塩基または塩基対からなる重合体を指し、DNA、cDNA、ゲノムDNA、化学合成DNA及びRNAを含む。また、天然以外の塩基を必要に応じて含むポリヌクレオチドも包含する。天然以外の塩基としては、例えば、4-アセチルシチジン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン、2'-O-メチルシチジン、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン、ジヒドロウリジン、2'-O-メチルプソイドウリジン、 β -D-ガラクトシルキユエオシン、2'-O-メチルグアノシン、イノシン、N6-

イソペンテニルアデノシン、1-メチルアデノシン、1-メチルプソイドウリジン、1-メチルグアノシン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアノシン、2-メチルアデノシン、2-メチルグアノシン、3-メチルシチジン、5-メチルシチジン、N6-メチルアデノシン、7-メチルグアノシン、5-メチルアミノメチルウリジン、5-メトキシアミノメチル-2-チオウリジン、 β -D-マンノシルキユエオシン、5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン、5-メトキシカルボニルメチルウリジン、5-メトキシウリジン、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデノシン、N-((9- β -D-リボフラノシル-2-メチルリオプリン-6-イル)カルバモイル)トレオニン、N-((9- β -D-リボフラノシルプリン-6-イル)N-メチルカルバモイル)トレオニン、ウリジン-5-オキシ酢酸-メチルエステル、ウリジン-5-オキシ酢酸、ワイプトキソシン、プソイドウリジン、キユエオシン、2-チオシチジン、5-メチル-2-チオウリジン、2-チオウリジン、4-チオウリジン、5-メチルウリジン、N-((9- β -D-リボフラノシルプリン-6-イル)カルバモイル)トレオニン、2'-O-メチル-5-メチルウリジン、2'-O-メチルウリジン、ワイプトシン、3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)ウリジン等が挙げられる。

【0039】

本発明のhERG遺伝子は、配列番号：1で表される核酸配列の遺伝子多型を含む。遺伝子多型は、データベース、例えば、GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)を利用することにより、容易に知ることができる。遺伝子多型には、一塩基多型 (SNP)、及び塩基配列の繰り返し数が異なっていることにより生じる多型が含まれる。また、複数の塩基 (例えば2個～数十塩基) の欠失又は挿入による多型も遺伝子多型に含まれる。さらに、2～数十塩基の配列が繰り返されている多型も遺伝子多型に含まれる。このような多型として、VNTR(variable number of tandem repeat) (繰り返しの単位が数塩基から数十塩基のもの)、及びマイクロサテライト多型 (2～4塩基単位程度のもの) がある。

【0040】

本発明のhERG遺伝子は、配列番号：2で表されるアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む。このようなアミノ酸配列をコードする核酸配列は、配列番号：1で表される核酸配列に加えて、遺伝子暗号の縮重により配列番号：1で表される核酸配列とは異なる核酸配列を含むものである。配列番号：1で表される核酸配列のほか、非コード領域を除いた領域のみであってもよい。本発明のポリヌクレオチドを遺伝子工学的な手法によりポリペプチドを発現させるのに用いる場合、使用する細胞のコドン使用頻度を考慮して、発現効率の高いヌクレオチド配列を選択し、設計することができる (Grantham et al. (1981) *Nucleic Acids Res.* 9: 43-74)。

【0041】

さらに、本発明のhERG遺伝子は、配列番号：1で表される核酸配列または該核酸配列に相補的な配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む。このようなポリヌクレオチドとしては、アイソフォーム、アルタナティブアイソフォーム、及びアレリック変異体があげられ、これらは、本発明のhERG遺伝子に含まれる。このようなhERG遺伝子は、配列番号：1で表される核酸配列からなるポリヌクレオチド、またはその断片をプローブとして、コロニーハイブリダイゼーション、プラークハイブリダイゼーション、サザンブロット等の公知のハイブリダイゼーション法により、ヒトのcDNAライブラリー及びゲノムライブラリーから得ることができる。cDNAライブラリーの作製方法については、『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.』(Cold Spring Harbor Press (1989))を参照することができる。また、市販のcDNAライブラリー及びゲノムライブラリーを用いてもよい。

【0042】

より具体的に、cDNAライブラリーの作製においては、まず、本発明のhERG遺伝子を発現する細胞、臓器、組織等からグアニジン超遠心法 (Chirwin et al. (1979) *Biochemistry* 18: 5294-9)、AGPC法 (Chomczynski and Sacchi (1987) *Anal. Biochem.* 162: 156-9)等の公知の手法により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia) 等を用いてmRNAを精製する。Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia)等の、細胞、臓器、組織等から直接mRNAを調製するためのキットを利用してもよい。次に得られたmRNAから逆転

写酵素を用いてcDNAを合成する。AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業) のようなcDNA合成のためのキットを使用することもできる。その他の方法として、cDNAはPCRを利用した5' -RACE法 (Frohman et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8998-9002; Belyavsky et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17: 2919-32) により合成、及び増幅させてもよい。また、全長率の高いcDNAライブラリーを作製するために、オリゴキャップ法 (Maruyama and Sugano (1994) Gene 138: 171-4; Suzuki (1997) Gene 200: 149-56) 等の公知の手法を採用することもできる。上述のようにして得られたcDNAは、適当なベクター中に組み込むことができる。

【0043】

本発明におけるハイブリダイゼーション条件において、ストリンジェントな条件としては、例えば、「2×SSC、0.1% SDS、50℃」、「2×SSC、0.1% SDS、42℃」、「1×SSC、0.1% SDS、37℃」、よりストリンジェントな条件としては、例えば「2×SSC、0.1% SDS、65℃」、「0.5×SSC、0.1% SDS、42℃」、「0.2×SSC、0.1% SDS、65℃」等の条件を挙げることができる。より詳細には、Rapid-hyb buffer (Amersham Life Science) を用いた方法として、68℃で30分以上プレハイブリダイゼーションを行った後、プローブを添加して1時間以上68℃に保ってハイブリッド形成させ、その後、2×SSC、0.1% SDS中、室温で20分の洗浄を3回、1×SSC、0.1% SDS中、37℃で20分の洗浄を3回、最後に、1×SSC、0.1% SDS中、50℃で20分の洗浄を2回行うことも考えられる。その他、例えばExpresshyb Hybridization Solution (CLONTECH) 中、55℃で30分以上プレハイブリダイゼーションを行い、標識プローブを添加し、37~55℃で1時間以上インキュベートし、2×SSC、0.1% SDS中、室温で20分の洗浄を3回、1×SSC、0.1% SDS中、37℃で20分の洗浄を1回行うこともできる。ここで、例えば、プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーションや2度目の洗浄の際の温度を上げることにより、よりストリンジェントな条件とすることができる。例えば、プレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションの温度を60℃、さらにストリンジェントな条件としては68℃とすることができる。当業者であれば、このようなバッファーの塩濃度、温度等の条件に加えて、その他のプローブ濃度、プローブの長さ、反応時間等の諸条件を加味し、本発明のhERG遺伝子をコードするポリヌクレオチドを得るための条件を設定することができる。

【0044】

ハイブリダイゼーション法の詳細な手順については、『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.』(Cold Spring Harbor Press (1989);特にSection 9.47-9.58)、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987-1997);特にSection 6.3-6.4)、『DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach 2nd ed.』(Oxford University (1995);条件については特にSection 2.10) 等を参照することができる。ハイブリダイズするポリヌクレオチドとしては、配列番号: 1 で表される核酸配列に対して少なくとも50%以上、好ましくは70%、さらに好ましくは80%、より一層好ましくは90% (例えば、95%以上、さらには99%) の同一性を有する核酸配列を含むポリヌクレオチドが挙げられる。このような同一性は、BLASTアルゴリズム (Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-8; Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-7) によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいたプログラムのうち、配列の同一性を決定するプログラムとして、アミノ酸配列についてはBLASTX、ヌクレオチド配列についてはBLASTN (Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10) 等が開発されており、本発明の配列に対して使用することができる。具体的な解析方法については、例えば、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 等を参照することができる。

【0045】

本発明のhERG遺伝子に含まれるhERGのアイソフォームやアレリック変異体等、hERGと類似した構造及び機能を有する遺伝子は、配列番号: 1 で表される核酸配列を基にプライマーを設計し、ヒトのcDNAライブラリー及びゲノムライブラリーから遺伝子増幅技術 (PCR) (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 6.1-6.4) により得ることができる。

【0046】

本発明のポリヌクレオチドには、配列番号：2で表されるアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、または該ポリヌクレオチド配列に相補的な配列が含まれる。これら本発明のポリヌクレオチドは、『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.』(Cold Spring Harbor Press (1989))、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987-1997);特にSection 8.1-8.5)、Hashimoto-Goto et al. (1995) Gene 152: 271-5、Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-92、Kramer and Fritz (1987) Method. Enzymol. 154: 350-67、Kunkel (1988) Method. Enzymol. 85: 2763-6等に記載の部位特異的変異誘発法等の方法に従って調製することができる。また、変異の誘発は前記の通り市販のキットを用いることもできる。

【0047】

本発明のポリヌクレオチドの塩基配列の確認は、慣用の方法により配列決定することにより行うことができる。例えば、ジデオキシヌクレオチドチェーンターミネーション法(Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463)等により行うことができる。また、適当なDNAシーケンサーを利用して配列を解析することも可能である。

【0048】

<ウイルスベクタープラスミド>

本発明により、本発明のhERG遺伝子を含むウイルスベクタープラスミド（以下、本発明のウイルスベクタープラスミドと称する場合がある）が提供される。ここで、ウイルスベクタープラスミドとは、ウイルス由来の塩基配列を利用して、任意の塩基配列を任意の細胞に組み込むことができるようにしたプラスミドをいう。本発明のウイルスベクタープラスミドは、本発明のhERG遺伝子を宿主細胞内に保持したり、該hERG遺伝子にコードされるhERGチャネルを発現させたりするのに有用である。

【0049】

ウイルスベクタープラスミドを使用する場合に基となるウイルスとしては、モロニー Maus 白血病ウイルス (Moloney murine leukemia virus, MoMLV) などのオンコレトロウイルス由来のものや、ヒト後天性免疫不全症候群ウイルス (Human immunodeficiency virus, HIV) などのレンチウイルス由来のものが挙げられる。

本発明において、レトロウイルスとは、レトロウイルス科 (Retroviridae)、オンコウイルス亜科 (Oncovirinae) のオンコウイルス属 (Oncovirus) に属するウイルスをいい、レンチウイルスとは、レトロウイルス科 (Retroviridae)、レンチウイルス亜科 (Lentivirinae) のレンチウイルス属 (Lentivirus) に属するウイルスをいう。

これまでにレトロウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターにより効率良く細胞の染色体中に安定した遺伝子導入・発現が可能であることが示されている(Kay, M.A. et al. Nature Med. vol.7 33-40 (2001))。本発明のウイルスベクタープラスミドには、pZi Pneo (Cepko, C.L. et al (1984) Cell. 37: 1053-1062)、pBabe Puro (Morgenstern, J.P. and Land, H. Nucleic Acids Res. vol.18 3587-3596)等のレトロウイルスベクタープラスミド、pLenti6/V5-GW/lacZ (Invitrogen, Carlsbad, CA. catalog K4955-10)等のレンチウイルスベクタープラスミド等様々なウイルスベクタープラスミドを用いることができる。また、レトロウイルスおよびレンチウイルス以外由来のウイルスベクター、例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(adeno-associated viral vector)、シンビスウイルス、センダイウイルス、トガウイルス、パラミクソウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス等を元に作製されたベクタープラスミドを利用することもできる。

【0050】

レトロウイルスベクターの中では、VSV-Gシュードタイプレトロウイルスベクターを使用することが望ましい。シュードタイプとは、一つのウイルスゲノムが別種のウイルスの外皮タンパク質に囲まれて発芽してくる現象である(Zavada, J. J.Gen.Virol. vol.15 183-191 (1972))。VSV (水疱性口内炎ウイルス: vesicular stomatitis virus, VSV) は、

ラブドウイルス科に属するネガティブ1本鎖RNAゲノムを持つウイルスであり、その外皮タンパク質 (Gタンパク質) の細胞側のレセプターはホスファチジルセリンをはじめとする陰イオン脂質であると考えられ (Schlegel, R. et al. Cell vol.32 639-646 (1983), Mastroianni, P. et al. J. Gen. Virol. vol.68 2359-2369 (1987))、通常用いられる両種指向性 (amphotropic) のレトロウイルスベクターに比較してきわめて広い宿主域を有する (Emi, N. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol.65 1202-1207 (1991), Arai, T. et al. Virol. vol. 260 109-115 (1999)) と共に超遠心操作により遺伝子導入能力を向上させることが報告されている (Burns, J.C. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol.90 8033-8037 (1993))。従って、このVSV-G遺伝子産物を外皮に持つシュードタイプレトロウイルスを作製することにより、本来の外皮蛋白質を持つレトロウイルスに比較して効率よく各種細胞にhERG遺伝子を導入することが可能となる。

【0051】

これらVSV-Gシュードタイプベクターの性質はレンチウイルスベクターにおいても同様であり、報告されているレンチウイルスベクターの多くがこのシュードタイプベクターである (Kay, M.A. et al. Nature Med. vol.7 33-40 (2001))。

【0052】

ウイルスベクタープラスミドの好ましい態様においては、ウイルスベクタープラスミドを導入した宿主細胞内で本発明のhERG遺伝子が発現されるように制御配列下に結合する。ここで「制御配列」とは、プロモーター及びターミネーターであり、場合によってトランスアクチベーター、転写因子、転写物を安定化するポリAシグナル、スプライシング及びポリアダニル化シグナル等が含まれる。このような制御配列は、それに連結されたポリヌクレオチドの発現に必要とされるすべての構成成分を含むものである。また、本発明のウイルスベクターは、選択可能なマーカーを含んでいてもよい。選択可能なマーカーとしては、例えば、薬剤耐性遺伝子 (ネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子等) や蛍光タンパク質 (GFP、EGFP等) などが挙げられる。さらに、細胞内で発現されたポリペプチドを細胞膜上へと移行させるために必要とされるシグナルペプチドをポリペプチドに付加するようにしてウイルスベクタープラスミドへ組み込むこともできる。さらに、必要に応じリンカーの付加、開始コドン (ATG)、終止コドン (TAA、TAGまたはTGA) の挿入を行ってもよい。

【0053】

哺乳動物及びその他の動物細胞を宿主とする場合には、アデノウイルスlateプロモーター (Kaufman et al. (1989) Mol. Cell. Biol. 9: 946)、CAGプロモーター (Niwa et al. (1991) Gene 108: 193-200)、CMV immediate earlyプロモーター (Seed and Aruffo (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3365-9)、EF1 α プロモーター (Mizushima et al. (1990) Nucleic Acids Res. 18: 5322; Kim et al. (1990) Gene 91: 217-23)、HSV TKプロモーター、SR α プロモーター (Takebe et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8: 466)、SV40プロモーター (Mulligan et al. (1979) Nature 277: 108)、SV40 earlyプロモーター (Genetic Engineering Vol.3, Williamson ed., Academic Press (1982) pp.83-141)、SV40 lateプロモーター (Gheysen and Fiers (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1: 385-94)、RSV (ラウス肉腫ウイルス)-LTRプロモーター (Cullen (1987) Methods Enzymol. 152: 684-704)、MM¹LV-LTRプロモーター、CMVエンハンサー、SV40エンハンサー、及びグロビンイントロン等を使用することができる。

【0054】

ウイルスベクタープラスミドへのhERG遺伝子の挿入は、リガーゼ反応により行うことができる。このとき、制限酵素サイトを利用することもできる (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 11.4-11.11; Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (1989) Section 5.61-5.63)。

【0055】

<ウイルスベクターの調製>

本発明において、ウイルスベクターとは、ウイルスベクタープラスミドを含有するウイ

ルスをいう。ウイルスベクターを調製するために、ウイルスベクタープラスミドをパッケージング細胞に導入する。パッケージング細胞には、293-EBNA細胞(Invitrogen, catalog R620-07)等を用いることができる。ウイルスベクタープラスミドは、アデノウイルス法、エレクトポレーション(電気穿孔)法(Cytotechnology 3: 133 (1990))、カチオニックリポソーム法(カチオニックリポソームDOTAP(Boehringer Mannheim)等)、正電荷ポリマーによる導入法、静電気型リポソーム(electrostatic type liposome)法、内包型リポソーム(internal type liposome)法、パーティクルガンを用いる方法、リポソーム法、リポフェクション法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413 (1987) (例えば、lipofectamine 2000 (Invitrogen)、Fugene 6 (Roche Diagnostics)など)、リン酸カルシウム法(特開平2-227075)、レセプター介在遺伝子導入法、レトロウイルス法、DEAEデキストラン法、ウイルス-リポソーム法(別冊実験医学『遺伝子治療の基礎技術』羊土社(1997);別冊実験医学『遺伝子導入&発現解析実験法』羊土社(1997); J. Clin. Invest. 93: 1458-64 (1994); Am. J. Physiol. 271: R1212-20 (1996); Molecular Medicine 30: 1440-8 (1993); 実験医学 12: 1822-6 (1994); 蛋白質核酸酵素 42: 1806-13 (1997); Circulation 92(Suppl. II): 479-82 (1995))、naked-DNAの直接導入法等によりパッケージング細胞に導入することができる。

【0056】

パッケージング細胞を適当な培地にて培養し、上記方法によりウイルスベクタープラスミドをトランスフェクションし、その後、一定時間培養し、培養液を回収することでウイルスベクターを得ることができる。また、トランスフェクション後、必要に応じて2から24時間後、好ましくは6から12時間後に培地を交換することができる。培地を交換した後、さらに12時間から72時間培養し、培養液を回収することでウイルスベクターを得ることができる。回収した培養液は、必要に応じて遠心操作、フィルター(0.45 μ mのフィルター(Millipore, MILLEX-HV, catalog#SLHV025LS)等)によるろ過を行うことができる。

【0057】

<ウイルスベクターの濃縮>

本発明のウイルスベクターは、そのままで用いることができるが、濃縮した方が、より好ましい。前記操作により得られたウイルスベクターを超遠心操作することで、濃縮ウイルスベクターを得ることができる。超遠心は、少なくとも35,000g(gは重力加速度を表す)以上、好ましくは55,000g以上を、少なくとも100分以上、好ましくは120分以上行う。超遠心は、例えば、超遠心装置XL-90(Beckman)および超遠心ローターSW28(Beckman)を用いて、19500 rpm, 100 分を行うことによりできる。

【0058】

<hERG遺伝子の導入>

本発明において、hERG遺伝子の細胞への導入は、本発明のウイルスベクターをそのまま用いることもできるが、濃縮したものを用いた方がより好ましい。

本発明のhERGチャネル発現細胞における宿主細胞には、哺乳類由来の真核細胞を用いることができ、好ましくは、CHO(中でもDHFR遺伝子欠損dhfr-CHO(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-20 (1980)及びCHO K-1(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60: 1275 (1968))が好適である)、COS、Hela、C127、3T3、BHK、HEK293、Bowesメラノーマ細胞等である。また、本発明のhERGチャネル発現細胞における宿主細胞には、心臓由来のセルライン、又は単離した心筋細胞若しくは洞房結節細胞を用いることもできる。本発明のhERG発現細胞には、一定条件下、例えば、薬剤刺激、電気刺激、熱刺激、光刺激などにより、転写を調節し、発現を調節することができる細胞も含まれる。

【0059】

宿主細胞を培養し、培養液にウイルスベクターを添加し、さらに培養することで遺伝子導入することができる。ウイルスベクターは、濃縮したものを用いるのが好ましい。添加するウイルスベクターには、必要に応じてpolybrene(Sigma H9268 別名 hexadimethrine bromide)を加えることができる。ウイルスを加えた後、24時間後に培地を交換するこ

とが好ましい。また、培地を交換した後、72時間程度培養することで細胞あたりの発現量を最大とすることができる。

【0060】

<hERGチャネル発現細胞>

以上の方法により、本発明のhERGチャネル発現細胞が提供される。培養は、選択した細胞に適した公知の方法により行う。例えば、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDM、F12等の培地を用い、必要に応じウシ胎児血清(FCS)等の血清、アミノ酸、グルコース、ペニシリン又はストレプトマイシンなどを添加することができ、pH約6~8、30~40℃において15~200時間前後の培養を行うことができる。その他、必要に応じ途中で培地の交換を行ったり、通気及び攪拌を行ったりすることができる。

【0061】

本発明の方法により得られたhERG遺伝子導入細胞の細胞集団の中には、チャネル発現細胞(以下、本発明のhERGチャネル発現細胞と称することがある)が多数存在しており、中でも、全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いたパッチクランプ法によって測定されるhERG電流が0.6 nA以上のhERGチャネル発現細胞を多く含むものである。その含有率は、hERG遺伝子が導入された細胞全体のうち、少なくとも40%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは60%以上、特に好ましくは70%以上、最も好ましくは80%以上である。hERG遺伝子が導入された細胞は、遺伝子の導入操作内容が実質同一である限り、同一実験系で導入された細胞全体を母数としてもよく、異なる実験系(例えば異なる実験日に行われた場合等)で導入された細胞を全体にまとめて母数としてもよい。hERG電流の細胞全体の平均は0.3 nA以上であり、好ましくは0.6 nA以上であり、より好ましくは0.8 nA以上であり、さらに好ましくは1.0 nA以上である。

hERGチャネル発現細胞の全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いたパッチクランプ法によって測定されるhERG電流は、後述のパッチクランプ法により測定することができる。なお、全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いたパッチクランプ法によって測定されるhERG電流が0.6 nA以上のhERGチャネル発現細胞の含有率は、無作為に選び出した複数の細胞それぞれについて、hERG電流を測定することにより、hERG電流が0.6 nA以上の細胞の割合を算出することができる。

【0062】

<hERGチャネル発現細胞のクローニング>

本発明のhERGチャネル発現細胞は、そのまま用いることも可能であるが、培養中に性質が偏ることを避け、安定した薬物評価を可能とするためにクローニングを行うことができる。細胞クローニングは、定法(例えば、限外希釈法、フローサイトメトリーによるセルソーティング等)により行うことができる。クローニング後の細胞株から、発現量の測定、パッチクランプ法によるhERGチャネルの機能的解析により最適なhERGチャネル発現細胞株を選別することができる。

【0063】

hERGチャネル発現細胞における発現量は、抗hERGチャネル抗体を用いた免疫組織学的な解析方法により測定できる。抗体は、定法により作製してもよく、市販のもの(例えば、Alomene Labs)を用いてもよい。免疫組織学的な解析方法としては、例えば、酵素免疫測定法(EIA)、放射免疫測定法(RIA)、ELISA法、Western blot法、フローサイトメトリー、免疫組織化学染色等があげられる。

【0064】

このクローニングにより、全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いたパッチクランプ法により測定されるhERG電流が、少なくとも0.4 nA以上、好ましくは0.6 nA以上、さらに好ましくは0.8 nA以上、より好ましくは1.0 nA以上、特に好ましくは1.2 nA以上の細胞がより容易に提供される。

【0065】

<hERG電流の測定方法>

本発明は、本発明のhERGチャネル発現細胞を用いることを特徴とするhERG電流を測定す

る方法、具体的には、本発明のhERGチャネル発現細胞を用いて、パッチクランプ法、好ましくは全自動ハイスループットパッチクランプシステムにより、hERG電流を測定する方法を提供する。

【0066】

hERGチャネル発現細胞は、前述の本発明のhERGチャネル発現細胞を作製する方法などにより得ることができる。本発明のhERG電流の測定方法において使用されるhERGチャネル発現細胞のhERGチャネル発現量は、全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いたパッチクランプ法により測定されるチャネル電流が、少なくとも0.4 nA以上、好ましくは0.6 nA以上、さらに好ましくは0.8 nA以上、より好ましくは1.0 nA以上、特に好ましくは1.2 nA以上であることが望ましい。なお、発現量が多いほどパッチクランプ法により測定されるチャネル電流が高くなる。

【0067】

本発明のhERG電流の測定方法を実施するためには、本発明のhERGチャネル発現細胞を、前述の適当な方法で一定期間培養し、測定に適したバッファーに懸濁する。バッファーは、pH 6～8のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのhERG電流に影響を与えないバッファーであれば何でもよい。好ましくはpH 7.4のphosphate buffered salineである。

【0068】

次に、パッチクランプ法、好ましくは全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いて、hERG電流を記録することができる。hERG電流は、種々の保持電位および脱分極パルスを経細胞に与えることにより誘発することができる。これらの条件については、当業者であれば容易に設定することができる(Zhou, Z et al, Biophysical Journal, 74, 230-241 (1998))。例えば、保持電位を、-80 mVから+20 mVへ1秒間、続いて、脱分極パルスを-50 mVへ1秒間与えることにより誘発することができる。hERG電流の大きさには、電位を戻した際に観察される末尾電流のピーク値を用いることができる。

【0069】

<本発明のhERGチャネル発現細胞を用いたhERG電流の阻害活性の測定方法>

hERG電流の阻害活性を有する化合物は、QT延長作用を伴う不整脈作用を有することが知られており、心室頻拍や突然死といった重篤な副作用を誘発することがある。そのため、安全性の高い医薬品開発には、その開発の対象となる被検物質がhERG電流に影響を与えないことを確認することが必須である。よって、本発明のhERGチャネル発現細胞を用いたhERG電流の阻害活性の測定方法は、hERG電流に影響を与えない被検化合物を選択することを容易とするものであり、従って、本発明の阻害活性測定方法は、種々の疾病の治療・予防剤などの医薬の開発に有用である。

【0070】

すなわち、本発明は、

(A) hERGチャネル発現細胞を用いることを特徴とするhERG電流の阻害活性の測定方法、具体的には、本発明のhERGチャネル発現細胞に、被検化合物を接触させることを特徴とするhERG電流の阻害活性の測定方法を提供する。本発明のhERG電流の阻害活性の測定方法においては、本発明のhERGチャネル発現細胞に、被検化合物を接触させる前と接触させた後における、例えば、該本発明のhERG電流を測定して比較することができる。

【0071】

(B) hERGチャネル発現細胞を用いることを特徴とするhERG電流を変化させ又は変化させない化合物もしくはその塩のスクリーニング方法、具体的には、本発明のhERGチャネル発現細胞に、被検化合物を接触させた場合と接触させない場合との比較を行なうことを特徴とするhERG電流を変化させ又は変化させない化合物もしくはその塩のスクリーニング方法を提供する。本発明のスクリーニング方法においては、本発明のhERGチャネル発現細胞に、被検化合物を接触させた場合と接触させない場合における、例えば、該本発明のhERG電流を測定して比較することができる。

【0072】

hERGチャネル発現細胞は、前述の本発明のhERGチャネル発現細胞を作製する方法などにより得ることができる。本発明のhERG電流の阻害活性の測定方法において、本発明のhERGチャネル発現細胞のhERGチャネル発現量は、全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いたパッチクランプ法により測定されるチャネル電流が、少なくとも0.4 nA以上、好ましくは0.6 nA以上、さらに好ましくは0.8 nA以上、より好ましくは1.0 nA以上、特に好ましくは1.2 nA以上である。なお、発現量が多いほどパッチクランプ法により測定されるチャネル電流が高くなり、高感度な測定系の構築が可能になる。

【0073】

本発明の(A)または(B)の前記の方法を実施するためには、本発明のhERGチャネル発現細胞を、前述の適当な方法で一定期間培養し、測定に適したバッファーに懸濁する。バッファーには、pH 6~8のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのhERG電流に影響を与えないバッファーであれば何でもよい。好ましくは、pH 7.4 phosphate buffered salineである。

【0074】

まず、パッチクランプ法、好ましくは全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いて、hERG電流を記録することができる。hERG電流は、種々の保持電位および脱分極パルスを経細胞に与えることにより誘発することができる。これらの条件については、当業者であれば容易に設定することができる。例えば、保持電位を、-80 mVから+20 mVへ1秒間、続いて、脱分極パルスを-50 mVへ1秒間与えることにより誘発することができる。hERG電流の大きさには、電位を戻した際に観察される末尾電流のピーク値を用いることができる。

【0075】

次に、hERGチャネル発現細胞に被検化合物を共存させる。このとき、コントロールとして、被検化合物を含まないものやhERG電流を阻害することが知られている化合物を加えた細胞も用意することができる。hERG電流を阻害する化合物としては、アステミゾール (Tallialet et al. (1998) Mol. Pharmacol. 54: 113-21)、E-4031 (Zhou et al. Biophys J. (1998) 74: 230-41)、リスベリドン (Kongsamut et al. Eur J Pharmacol. (2002) 450: 37-41)、ベラパミル (Zhang et al. (1999) Circ. Res. 84: 989-98)、キニジン (Jiesheng et al. J Pharmacol Exp Ther. (2001) 299: 290-6.) があげられる。反応は、例えば、15℃から37℃、好ましくは20℃から30℃で、10秒から60分、好ましくは3分から10分行う。

【0076】

そして、パッチクランプ法、好ましくは全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いて、hERG電流を記録することができる。hERG電流は、被検化合物共存前と同条件により誘発することができる。hERG電流の大きさには、電位を戻した際に観察される末尾電流のピーク値を用いることができる。

【0077】

例えば、被検化合物を接触させる前のhERG電流を100%、0 nAを0%とすることで、被検化合物を接触させた後のhERG電流から抑制率を算出し、被検化合物のhERG電流に対する阻害活性を測定できる。被検化合物の用量を変化させることで、被検化合物固有の阻害活性を算出することも可能である。また、hERG電流を50%阻害する濃度が、少なくとも0.3 μ M以上、好ましくは1.0 μ M以上、より好ましくは3.0 μ M以上、特に好ましくは10 μ M以上、最も好ましくは30 μ M以上である場合には、hERG電流に影響を与えないと判断することができる。

【0078】

被検化合物としては、例えばペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

【0079】

＜本発明のhERGチャネル発現細胞によるFLIPR Membrane Potential Assay Kitを用いた

膜電位変化の測定方法>

本発明は、hERGチャネル発現細胞によるFLIPR Membrane Potential Assay Kit (Molecular Devices) を用いた膜電位変化の測定方法を提供する。

具体的には、以下のように操作を行うことで、測定することができる。本発明のhERGチャネル発現細胞を、前述の適当な方法で一定期間培養し、測定に適したバッファーに懸濁する。バッファーには、pH 6~8 のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのhERG電流に影響を与えないバッファーであれば何でもよく、好ましくは、pH 7.4 phosphate buffered salineである。細胞懸濁液は、 0.2×10^5 cells/ml から 1.0×10^6 cells/ml の濃度に調製することが好ましい。次に、懸濁した細胞をプレート（例えば、Biocoat Poly-D-Lysine 384-Well Black/Clear Plate (BECKTON DICKINSON) 等を利用する）に蒔き、さらに培養する。細胞は、500から25000 cells/wellになるように蒔くことができる。また、二日間程度培養することが好ましい。次に、FLIPR Membrane Potential Assay Kit (Molecular Devices) のComponent Aを測定用緩衝液（130 mM NaCl、5 mM KCl、1 mM MgCl₂、1 mM CaCl₂、24 mM Glucose、10 mM HEPES、（最終pH約7.25））に溶解し、1ウェル当たり25 μ l加える。Component Aを添加してから約1時間後、FLIPR (Molecular Devices) 又はFDSS6000（浜松ホトニクス社）を用いて膜電位変化の測定を行うことができる。測定プログラムは、当業者にとって適当な条件を設定でき、例えば、被検化合物添加前に10回、添加後に50回、6秒毎とすることができる。測定は室温で行うことができる。hERG阻害活性は、被検化合物添加により変化した蛍光強度から算出することができる。陽性対照として、E4031、Dofetilide等を用いることができる。

【0080】

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA : デオキシリボ核酸
cDNA : 相補的デオキシリボ核酸
A : アデニン
T : チミン
G : グアニン
C : シトシン
RNA : リボ核酸
mRNA : メッセンジャーリボ核酸
Gly 又は G : グリシン
Ala 又は A : アラニン
Val 又は V : バリン
Leu 又は L : ロイシン
Ile 又は I : イソロイシン
Ser 又は S : セリン
Thr 又は T : スレオニン
Cys 又は C : システイン
Met 又は M : メチオニン
Glu 又は E : グルタミン酸
Asp 又は D : アスパラギン酸
Lys 又は K : リジン
Arg 又は R : アルギニン
His 又は H : ヒスチジン
Phe 又は F : フェニルアラニン
Tyr 又は Y : チロシン
Trp 又は W : トリプトファン

P r o 又は P : プロリン
A s n 又は N : アスパラギン
G l n 又は Q : グルタミン

【0081】

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

- 〔配列番号：1〕 GenBank アクセッション番号U04270で表される核酸配列を示す。
- 〔配列番号：2〕 GenBank アクセッション番号U04270で表されるアミノ酸配列を示す。
- 〔配列番号：3〕 hERG遺伝子をクローニングするためのプライマー塩基配列を示す。
- 〔配列番号：4〕 hERG遺伝子をクローニングするためのプライマー塩基配列を示す。
- 〔配列番号：5〕 hERG遺伝子をクローニングするためのプライマー塩基配列を示す。
- 〔配列番号：6〕 hERG遺伝子をクローニングするためのプライマー塩基配列を示す。
- 〔配列番号：7〕 hERG遺伝子をクローニングするためのプライマー塩基配列を示す。
- 〔配列番号：8〕 hERG遺伝子をクローニングするためのプライマー塩基配列を示す。
- 〔配列番号：9〕 multicloning siteを挿入するための塩基配列を示す。
- 〔配列番号：10〕 multicloning siteを挿入するための塩基配列を示す。
- 〔配列番号：11〕 central polypurine tractを挿入するための塩基配列を示す。
- 〔配列番号：12〕 central polypurine tractを挿入するための塩基配列を示す。
- 〔配列番号：13〕 pBabe Puroの核酸配列を示す。

【実施例】

【0082】

以下に、具体的な例をもって本発明を示すが、本発明はこれに限られるものではない。

〔実施例1〕 hERG遺伝子の調製

hERG遺伝子の単離は、配列番号：1で表される核酸配列を基にして、以下のように行った。ここでは4070 bpsが示されており、hERGチャネルをコードする領域(ストップコドンを除く)は、184-3660 (3477 bps, 1159アミノ酸残基)とされている(GenBank アクセッション番号U04270)。PCR (polymerase chain reaction) により遺伝子を単離するために、配列番号：3から8までに示すoligo DNA primerを作製した(日本バイオサービス(埼玉県朝霞市)に依頼)。

ヒト脳polyA⁺ RNA (Clontech, Palo Alto, CA. catalog #6516-1)を鋳型としてSuperscript First-Strand Synthesis System (Invitrogen/Gibco, MD)によりcDNAを作製した。次に、このcDNA鋳型とし、配列番号：3および4、配列番号：5および6並びに配列番号：7および8からなるoligo DNAをプライマーとして、Expand High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を用い、(95℃ 30秒-61℃ 30秒-68℃1分)を30回繰り返すことによりPCR反応を行った。プライマーの塩基配列は以下の通りである。

プライマー：AATTGGTACCATGGGCTCAGGATGCCGGTGC (配列番号3)

プライマー：GCTTGACTCAGGCAGCACGT (配列番号4)

プライマー：CCACCAGTGACCGTGAGATCA (配列番号5)

プライマー：TTGCAGTGCTGCAGCAGTGAG (配列番号6)

プライマー：ATGCTAGCATCTTCGGCAACG (配列番号7)

プライマー：AATTAAGCTTTTTCGAGTTCCTCTCCCCTTC (配列番号8)

その結果、それぞれ約1.2, 1.2, 1.6 kbのDNA断片を得た。

これらのDNA断片は、pT7Blue (Novagen, Darmstadt, Germany, catalog 69967-3)に挿入し、ABI prism DNA sequencing kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA)により配列を確認した。その結果、配列番号：3および4からなるプライマーの組み合わせによって得られた1179 bpsの配列は、配列番号：1における173 bpから1351 bpと同一であった。一方、配列番号：5および6からなるプライマーの組み合わせによって得られた1168 bpsの配列中には2つの変異(A1875G, T2149C)が見られたが、これらの変異は、該当部位の核酸配列から翻訳されるアミノ酸 (Leu, Tyr)には影響を与えないことが明らかである。また、配列番号：7および8からなるプライマーの組み合わせによって得られた1642 bpsの配列中には2つの変異(C2420T, A3367G)が見られたが、今回得られた複

数のクローンで同一の変異を有していたことから、今回使用している試料中（ヒト脳poly A+ RNA (Clontech, Palo Alto, CA. catalog #6516-1)）のhERG遺伝子として正しいと判断した。

【0083】

pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA)を制限酵素KpnIおよびXhoIで切断した。また、配列番号：3および4からなるプライマーの組み合わせによって得られたDNA断片を制限酵素KpnIおよびBstEIIで、配列番号：5および6からなるプライマーの組み合わせによって得られたDNA断片を制限酵素BstEIIおよびXhoIで切断した。次に、ここで得られたDNA断片を、制限酵素KpnIおよびXhoIで切断されたpBluescript中へ、リガーゼ反応（TaKaRa, Cat.6022）により挿入してpBS-1&14&15&18を作製した。

pBluescriptを制限酵素HindIIIおよびXhoIで切断した。また、配列番号：7および8からなるプライマーの組み合わせによって得られたDNA断片を制限酵素HindIIIおよびSacIで切断した。次に、ここで得られたDNA断片を、制限酵素HindIIIおよびXhoIで切断されたpBluescript中へ、リガーゼ反応により挿入してpBS-6&4を作製した。

さらに、pREP7 (Invitrogen, Carlsbad, CA.)をKpnIおよびHindIIIで切断した。また、pBS-1&14&15&18をKpnIおよびXhoIで、pBS-6&4をXhoIおよびHindIIIで切断した。次に、ここで得られたDNA断片をKpnIおよびHindIIIで切断されたpREP7中へリガーゼ反応により挿入して、hERG遺伝子を含むpREP7HERGを得た。

【0084】

〔実施例2〕レトロウイルスベクタープラスミドの調製

pBabe Puro (Morgenstern, J.P. and Land, H. Nucleic Acids Res. vol.18 3587-3596)（配列番号13）から、制限酵素SalIおよびClaIで切断することによりSV40 promoter-puro(r)を除き、末端をKlenow fragment (Takara, Otsu, Japan)により平滑化した。ここへpIRESpuro (Clontech, Palo Alto, CA. catalog #6031-1)から制限酵素NsiIおよびXbaIで切断することによりIRES-puro(r)を切り出し、T4 polymeraseにより末端を平滑化したものを挿入しpBabeXIPを得た(図1)。

【0085】

pBabe Puro (Morgenstern, J.P. and Land, H. Nucleic Acids Res. vol.18 3587-3596)（配列番号13）からSalIおよびClaIで切断することによりSV40 promoter-puro(r)を除き、末端をKlenow fragmentにより平滑化した。ここへpIRESHyg (Clontech, Palo Alto, CA. catalog #6061-1)からNsiIおよびXbaIで切断することによりIRES-hyg(r)を切り出し、T4 polymeraseにより末端を平滑化したものを挿入しpBabeXIHを得た(図2)。

【0086】

pBabeXIPから制限酵素SspIおよびBamHIで切断することにより5' -LTR-packaging signalを除いた。ここへpCLXSN(IMGENEX San Diego, CA. catalog #10041P)から制限酵素SspIおよびBamHIで切断することにより切り出した5' LTR-CMV promoter-packaging signalを挿入しpBabeCLXIPを得た(図3)。

pBabeXIHからSspIおよびBamHIで切断することにより5' -LTR-packaging signalを除いた。ここへpCLXSN(IMGENEX San Diego, CA. catalog #10041P)からSspIおよびBamHIで切断することにより切り出した5' LTR-CMV promoter-packaging signalを挿入しpBabeCLXIHを得た(図4)。

pBabeCLXIHから制限酵素BglIIで切断することによりIRES-hyg(r)を除き、末端をKlenow fragmentにより平滑化した。ここへpIRES2-EGFP (Clontech, Palo Alto, CA. catalog #6029-1)から制限酵素HincIIで切断することによりIRES-EGFPを切り出したものを挿入しpBabeCLXI2Gを得た(図5)。

pBabeCLXIHからBglIIで切断することによりIRES-hyg(r)を除き、末端をKlenow fragmentにより平滑化した。ここへpIRES2-neo2 (Clontech, Palo Alto, CA. catalog #6938-1)からNsiIおよびXbaIで切断することによりIRES-neo(r)を切り出し、T4 polymeraseにより末端を平滑化したものを挿入しpBabeCLXaINを得た(図6)。

【0087】

[実施例3] hERG遺伝子導入用レトロウイルスベクタープラスミドの調製

実施例2で得たpBabeCLXaINを制限酵素HpaIで切断した。ここへ実施例1で得たpREP7HERGからKpnIおよびHindIIIで切断することによりhERG遺伝子を切り出し、T4 polymeraseにより末端を平滑化したものを挿入しpBabeCL(hERG)aINを得た(図7)。

実施例2で得たpBabeCLXIHをHpaIで切断した。ここへ実施例1で得たpREP7HERGからKpnIおよびHindIIIで切断することによりhERG遺伝子を切り出し、T4 polymeraseにより末端を平滑化したものを挿入しpBabeCL(hERG)IHを得た(図8)。

実施例2で得たpBabeCLXIPをHpaIで切断した。ここへ実施例1で得たpREP7HERGからKpnIおよびHindIIIで切断することによりhERG遺伝子を切り出し、T4 polymeraseにより末端を平滑化したものを挿入しpBabeCL(hERG)IPを得た(図9)。

実施例2で得たpBabeCLXI2GをHpaIで切断した。ここへ実施例1で得たpREP7HERGからKpnIおよびHindIIIで切断することによりhERG遺伝子を切り出し、T4 polymeraseにより末端を平滑化したものを挿入しpBabeCL(hERG)I2Gを得た(図10)。

実施例2で得たpBabeCLXIHをBglIIで切断し、IRES-hyg(r)を除き、末端をKlenow fragmentで平滑化した。ここへ実施例1で得たpREP7HERGからKpnIおよびHindIIIで切断することによりhERG遺伝子を切り出し、T4 polymeraseにより末端を平滑化したものを挿入しpBabeCL(hERG)を得る(図11)。

【0088】

[実施例4] レンチウイルスベクタープラスミドの調製

マルチクローニング部位(multicloning site)挿入のために配列番号: 9および10からなるoligo DNAを作製した(日本バイオサービス(埼玉県朝霞市)に依頼)。oligo DNAの塩基配列を以下に示す。

oligo DNA:

GATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCGTTAACGTCGACCTCGAGGGTAC (配列番号9)

oligo DNA: CCTCGAGGTCGACGTTAACGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGG (配列番号10)

配列番号9及び10のoligo DNAを、98℃、5分間の熱変性後に緩やかに室温に戻すことでアニーリングさせた。

pLenti6/V5-GW/lacZ (Invitrogen, Carlsbad, CA. catalog K4955-10)からBamHIおよびKpnIで切断することによりlacZ-V5 epitope-SV40 early promoter-EM7 promoter-blasticidin(r)を除き、ここへ上記oligo DNAを挿入しpLenti6/MCSを得た(図12)。

central polypurine tract (cPPT)を導入し遺伝子導入能力を上昇させるために報告されている方法を参考にして、配列番号: 11および12に示すoligo DNA プライマーを作製した(Zennou, V.Z. et al. Cell vol.101 173-185 (2000))(日本バイオサービス(埼玉県朝霞市)に依頼)。

プライマー: GTCGTCATCGATACAAATGGCAGTATTCATCC (配列番号11)

プライマー: GTCGTCAAGCTTCCAACTGGATCTCTGCTGTCC (配列番号12)

配列番号: 11および12からなるoligo DNAをプライマーとして、Expand High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を用い、(95℃ 30秒-61℃ 30秒-68℃1分)を30回繰り返すことによりPCR反応を行った。その結果、約0.2kbのDNA断片を得た。これらのDNA断片は、pT7Blue (Novagen, Darmstadt, Germany, catalog 69967-3)に挿入し、cPPT-pT7Blueを得た。このDNA断片の塩基配列は、ABI prism DNA sequencing kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA)により配列が報告されているcPPT (Zennou, V.Z. et al. Cell vol.101 173-185 (2000))と同一であることを確認した。

pBluescript (Staratagene)を制限酵素ClaIおよびBamHIで切断し、ここへcPPTを含むClaIおよびHindIIIで切断したcPPT-pT7Blue並びにCMV promoterを含むBamHIおよびHindIIIで切断したpLenti6/MCSを挿入しcPPT-CMV-pBSを得た。pLenti6/MCSをClaIおよびBamHIで切断してCMV promoterを除き、ここへcPPT-CMV promoterを含むClaIおよびBamHIで切断したcPPT-CMV-pBSを挿入しpLenti6/cPPT-MCSを得た(図13)。

【0089】

【実施例5】 hERG遺伝子導入用レンチウイルスベクタープラスミドの調製

実施例4で得たpLenti6/cPPT-MCSをHpaIで切断する。ここへ実施例1で得たpREP7HERGからKpnIおよびHindIIIによりhERG遺伝子を切り出し、T4 polymeraseにより末端を平滑化したものを挿入しpLenti6/cPPT-hERGを得る(図14)。

【0090】

【実施例6】 ベクタープラスミドの調製

実施例1で得たpREP7HERGからKpnIおよびHindIIIで切断することによりhERG遺伝子を切り出し、KpnIおよびHindIIIで開環したpZeoSV2 (Invitrogen社) に挿入しpZeoHERGを得た。

pZeoHERGをdam-大腸菌株SCS110に導入し、大量培養の後、SV40 promoter-hERG 遺伝子 (ClaI/fill-in-HindIII) を、pcDNA3.1 NeoからCMV promoterを除いたDNA断片 (NruI-HindIIIで開環した物) に導入しpSV hERG-Neoを作製した。発現ベクターの大量培養は定法にて行い、ベクターの精製は、EndoFree Plasmid Kit (Qiagen社製) を用いて行った。

【0091】

【実施例7】 hERG遺伝子導入用レトロウイルスベクターの調製

2×10^6 の293-EBNA細胞 (Invitrogen, catalog R620-07) を10 cmコラーゲンコートディッシュ (IWAKI 東京 catalog 4020-010) にDMEM (Sigma catalog D5796)-10% fetal bovine serum (FCS)-penicillin/streptomycin (PS) (以下、EBNA培養液とする) 10 mlを用いて培養した。翌日、pV-gp (pVPack-GP (Stratagene catalog#217566) からNsiIおよびXbaIで切断することによりIRES-hisDを除きT4 polymeraseによる平滑化後、自己環化したもの)、pVPack-VSV-G (Stratagene, catalog#217567)、および実施例4で得たhERG遺伝子導入用レトロウイルスベクタープラスミドをそれぞれ $3.3 \mu\text{g}$ をリポフェクション試薬であるTransIT (Panvera, Madison, WI. catalog MIR2300)を用いてトランスフェクションした。その6-12時間後にEBNA培養液を交換し、 37°C で培養を続けた。

トランスフェクション2日後に培養液を回収し、 $1,200 \text{ g}$ で10分間遠心した。その上清を $0.45 \mu\text{m}$ のフィルター (Millipore, MILLEX-HV, catalog#SLHV025LS) でろ過したものを非濃縮レトロウイルスベクターとして以後の実験に供した。

【0092】

【実施例8】 hERG遺伝子導入用レンチウイルスベクターの調製

4×10^6 の293-EBNA細胞 (Invitrogen, catalog R620-07) を10 cmコラーゲンコートディッシュ (IWAKI 東京 catalog 4020-010) にDMEM (Sigma catalog D5796)-10% fetal bovine serum (FCS)-penicillin/streptomycin (PS) (以下、EBNA培養液とする) 10 mlを用いて培養する。翌日、pLP1, pLP2, pLP/VSVG (いずれもInvitrogen, catalog K4970-10)、および実施例6で得るヒトhERG遺伝子導入用レンチウイルスベクタープラスミド、それぞれ $2.5 \mu\text{g}$ をリポフェクション試薬であるTransIT (Panvera, Madison, WI. catalog MIR2300)を用いてトランスフェクションする。その6-12時間後にEBNA培養液を交換し、 37°C で培養を続ける。

トランスフェクション2日後に培養液を回収し、 $1,200 \text{ g}$ で10分間遠心する。その上清を $0.45 \mu\text{m}$ のフィルター (Millipore, MILLEX-HV, catalog#SLHV025LS) でろ過したものを非濃縮レンチウイルスベクターとして以後の実験に供する。

【0093】

【実施例9】 レトロウイルスベクターの濃縮

実施例7で調製したウイルスベクターの濃縮を以下のように行った。

超遠心用チューブ50 Ultra-Clear Tubes (Beckman, Palo Alto, CA. catalog 344058) を70%エタノールで消毒後に蒸留水ですすぎ、ここへ非濃縮ウイルスベクター約35 mlを入れた。これを超遠心ローターSW28 (Beckman) に入れ、超遠心装置XL-90 (Beckman) を使って19,500 rpm 100分間の遠心操作を行った。遠心後、上清を捨てたチューブを氷に入れて放置した。一時間後、チューブ壁面に残った培養液約 $100 \mu\text{l}$ 程度の濃縮ウイルスベクター溶液が得られた。必要に応じて、濃縮ウイルスベクター溶液を集め再度超遠心操作を行って再

濃縮ウイルスベクター溶液を調製した。

【0094】

[実施例10] レンチウイルスベクターの濃縮

実施例8で調製したウイルスベクターの濃縮を以下のように行う。超遠心用チューブ50 Ultra-Clear Tubes (Beckman, Palo Alto, CA. catalog344058)を70%エタノールで消毒後に蒸留水ですすぎ、ここへ非濃縮ウイルスベクター約35 mlを入れる。これを超遠心ローターSW28 (Beckman)に入れ、超遠心装置XL-90 (Beckman)を使って19,500 rpm 100分間の遠心操作を行う。遠心後、上清を捨てたチューブを氷に入れて放置する。一時間後、チューブ壁面に残った培養液約100 μ l程度の濃縮ウイルスベクター溶液が得られる。必要に応じて、濃縮ウイルスベクター溶液を集め再度超遠心操作を行って再濃縮ウイルスベクター溶液を調製する。

【0095】

[実施例11] hERG遺伝子導入用レトロウイルスベクターによるhERG発現細胞の調製

実施例7で調製したウイルスベクターによる細胞へのhERG遺伝子導入を以下のように行う。

3×10^3 のChinese Hamster Ovary (CHO)-K1細胞(理化学研究所ジーンバンク細胞開発銀行)を96 well plate (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ. catalog35-3075)にDMEM/F12 (Invitrogen corp. catalog11320-033)-10% fetal bovine serum (FCS)-penicillin/streptomycin (PS) (以下、CHO培養液とする)100 μ lを用いて培養する。翌日、実施例7で調製したウイルスベクター100 μ lを、培養液で調製したpolybrene (最終濃度8 μ g/ml) (Sigma H9268 別名 hexadimethrine bromide)とともにCHO細胞に加える。その翌日、ウイルスベクターを含む培養液をCHO培養液200 μ lと交換し、さらに、3日間培養する。ここで得られたhERG遺伝子導入細胞は、mixed populationとしておおよそその性質を知るために以下の実験に供すると共に、必要に応じて実施例17に示す細胞クローニングを行って以下の実験に供する。

【0096】

[実施例12] hERG遺伝子導入用レンチウイルスベクターによるhERG発現細胞の調製

実施例8で調製したウイルスベクターによる細胞へのhERG遺伝子導入を以下のように行う。

3×10^3 のChinese Hamster Ovary (CHO)-K1細胞(理化学研究所ジーンバンク細胞開発銀行)を96 well plate (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ. catalog35-3075)にDMEM/F12 (Invitrogen corp. catalog11320-033)-10% fetal bovine serum (FCS)-penicillin/streptomycin (PS) (以下、CHO培養液とする)100 μ lを用いて培養する。翌日、実施例8で調製したウイルスベクター100 μ lを、培養液で調製したpolybrene (最終濃度8 μ g/ml) (Sigma H9268 別名 hexadimethrine bromide)とともにCHO細胞に加える。その翌日、ウイルスベクターを含む培養液をCHO培養液200 μ lと交換し、さらに、3日間培養する。ここで得られたhERG遺伝子導入細胞は、mixed populationとしておおよそその性質を知るために以下の実験に供すると共に、必要に応じて実施例17に示す細胞クローニングを行って以下の実験に供する。

【0097】

[実施例13] hERG遺伝子導入用レトロウイルスベクターによるhERG発現細胞の調製-1

実施例9で遠心濃縮したウイルスベクターによる細胞へのhERG遺伝子導入を以下のように行った。

3×10^3 のChinese Hamster Ovary (CHO)-K1細胞(理化学研究所ジーンバンク細胞開発銀行)を96 well plate (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ. catalog35-3075)にDMEM/F12 (Invitrogen corp. catalog11320-033)-10% fetal bovine serum (FCS)-penicillin/streptomycin (PS) (以下、CHO培養液とする)100 μ lを用いて培養した。翌日、実施例9で遠心濃縮したウイルスベクター100 μ lを、培養液で調製したpolybrene (最終濃度8 μ g/ml) (Sigma H9268 別名 hexadimethrine bromide)とともにCHO細胞に加えた。その翌日、ウイルスベクターを含む培養液をCHO培養液200 μ lと交換し、さらに、3日間培養した。

ここで得られたhERG遺伝子導入細胞は、mixed populationとしておおよその性質を知るために以下の実験に供すると共に、必要に応じて実施例17に示す細胞クローニングを行って以下の実験に供した。

【0098】

【実施例14】 hERG遺伝子導入用レトロウイルスベクターによるhERG発現細胞の調製—2
実施例17に示す細胞クローニングを行い、適切なhERG電流が記録できた細胞株に対して、実施例9で遠心濃縮したウイルスベクターによる細胞へのhERG遺伝子導入を以下のように行った。

実施例13で得られたhERG発現細胞株 (3×10^3) を96 well plate (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ. catalog35-3075) にDMEM/F12 (Invitrogen corp. catalog11320-033)-10% fetal bovine serum (FCS)-penicillin/streptomycin (PS) (以下、CHO培養液とする) $100 \mu\text{l}$ を用いて培養した。翌日、実施例9で遠心濃縮したウイルスベクター $100 \mu\text{l}$ を最終濃度 $8 \mu\text{g/ml}$ となるように、培養液で調製したpolybrene (最終濃度 $8 \mu\text{g/ml}$) (Sigma H9268 別名 hexadimethrine bromide) とともにCHO細胞に加えた。その翌日、ウイルスベクターを含む培養液をCHO培養液 $200 \mu\text{l}$ と交換し、さらに、3日間培養した。ここで得られたhERG遺伝子導入細胞は、mixed populationとしておおよその性質を知るために以下の実験に供すると共に、必要に応じて実施例17に示す細胞クローニングを行って以下の実験に供した。

【0099】

【実施例15】 hERG遺伝子導入用レンチウイルスベクターによるhERG発現細胞の調製
実施例10で遠心濃縮したウイルスベクターによる細胞へのhERG遺伝子導入を以下のように行う。

3×10^3 のChinese Hamster Ovary (CHO)-K1細胞(理化学研究所ジーンバンク細胞開発銀行)を96 well plate (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ. catalog35-3075) にDMEM/F12 (Invitrogen corp. catalog11320-033)-10% fetal bovine serum (FCS)-penicillin/streptomycin (PS) (以下、CHO培養液とする) $100 \mu\text{l}$ を用いて培養する。翌日、実施例10で遠心濃縮したウイルスベクター $100 \mu\text{l}$ を、培養液で調製したpolybrene (最終濃度 $8 \mu\text{g/ml}$) (Sigma H9268 別名 hexadimethrine bromide) とともにCHO細胞に加える。その翌日、ウイルスベクターを含む培養液をCHO培養液 $200 \mu\text{l}$ と交換し、さらに、3日間培養する。ここで得られたhERG遺伝子導入細胞は、mixed populationとしておおよその性質を知るために以下の実験に供すると共に、必要に応じて実施例17に示す細胞クローニングを行って以下の実験に供する。

【0100】

【実施例16】 リポフェクション法を用いたhERG遺伝子導入用ベクターによるhERG発現細胞の調製

CHO-K1細胞(理研ジーンバンク・細胞開発銀行)へのhERG遺伝子導入用ベクターの導入をEffectene Transfection Reagent Handbookに従って以下のように行った。

直径6cm培養シャーレに2日間培養したCHO-K1細胞に、TE溶液に溶解した約 $1 \mu\text{g}$ のhERG発現ベクター (SV-hERG-neo) と $8 \mu\text{L}$ のEnhancerを最終容量 $150 \mu\text{L}$ になるように混和し、約1秒間攪拌した後、室温で2-5分間静置した。次に、Effectene Transfection Reagentを $25 \mu\text{L}$ 加え約10秒間攪拌した後、室温で5-10分間静置し、培地を 1mL 加えた。この溶液を、細胞をPBS(-)で洗浄し、 4mL の培地を加えた培養シャーレに添加し、 37°C 、5% CO_2 インキュベーターで培養した。翌日、トリプシンにて細胞を培養シャーレから剥がし、 $500 \mu\text{g}$ 力価のG418を含む培地に懸濁した。数日間培養した後、実施例17に示す細胞クローニングを行って以下の実験に供した。

【0101】

【実施例17】 hERGチャネル発現細胞のクローニング

細胞のクローニングは限外希釈法にて行った。96 well培養プレートの1 wellあたり0.3個の細胞になるように細胞懸濁液を調整し、各wellに $200 \mu\text{L}$ ずつ分注した。約2週間後、顕微鏡観察下で、1つのwellに1つの細胞集団(コロニー)が観察されたwellの細胞を24 w

ell培養プレートに移し継続して培養した。また、その後F75培養フラスコまで規模を拡張し、ウェスタンブロット法によるタンパク発現の確認と電気生理学的手法によるhERGチャネルの機能的発現によりhERGチャネル発現細胞株を選別した（実施例18および19）。

【0102】

〔実施例18〕 ウェスタンブロット法によるhERGチャネルの検出

本試験は、CHO-K1細胞、リポフェクション法でhERG遺伝子を導入した細胞株（実施例16）およびレトロウイルスでhERG遺伝子を導入した細胞株（実施例14）を用いて行った。6穴プレートにて培養したそれぞれの細胞を、氷冷PBSにて洗浄し、Protease Inhibitor Cocktail (SIGMA-Aldrich Co.) を添加したLysis Buffer (150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 5 mmol/L EDTA, 0.5% NonidetR P-40, 0.5% Deoxycholic Acid Sodium) を加え、セルスクレイパーで剥がした。剥がした細胞をエッペンドルフチューブに回収し、4℃にて10,000 rpm (遠心機: MRX-152、ローター: TMA-6、トミー精工) で3分間遠心した後、上清をサンプルとして回収した。サンプルのタンパク質濃度は、BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA) を用いて測定した。

タンパク質の電気泳動、転写にはNOVEX (Invitrogen) の装置を使用した。回収したサンプルに、NuPAGE LDS Sample Buffer (Invitrogen) およびNuPAGE Sample Reducing Agent (Invitrogen) を適量加え、95℃にて3分間加熱した。NuPAGE 3-8% Tris-Acetate Gel (Invitrogen) にサンプルをアプライし、NuPAGE Tris-Acetate Running Buffer (Invitrogen) を用いて120 Vで約一時間電気泳動を行った。電気泳動を終えたゲルを、Immun-Blot PVDF Membrane (Bio-Rad Laboratories, Inc.) とともにXcell Surelock™ (Invitrogen) にセットし、NuPAGE Transfer Buffer (Invitrogen) を用いて30 Vで約一時間、転写を行った。

一次抗体にはAnti-HERG (Alomone Labs) を、二次抗体にはAnti Rabbit IgG HRP-linked Antibody (Cell Signaling Technology, Inc.) を用いた。一次抗体反応後と二次抗体反応後には、0.1 % Tween20/PBSにてPVDF Membraneの洗浄を行った。結合抗体の検出には、ECL detection kit (Amersham Biosciences Corp.) を用いた。

その結果、normal CHO-K1細胞にはhERGタンパクに相当する分子量約150kDのバンドは全く検出されなかった（図15、レーン1）。また、リポフェクション法でhERG遺伝子を導入し樹立した細胞株M3細胞には、わずかにhERGタンパクのバンドが検出された（図15、レーン2）。それに対して、レトロウイルスでhERG遺伝子を導入した細胞株には明らかに多量のhERGタンパクが検出された（図15、レーン3）。

【0103】

〔実施例19〕 全自動ハイスループットパッチクランプシステムによるhERG電流の測定および電流分布比較

リポフェクション法でhERG遺伝子を導入した細胞株（実施例16）およびレトロウイルスでhERG遺伝子を導入した細胞（実施例13）および細胞株（実施例14）を用いて行った。hERGチャネル発現細胞をF75培養フラスコで培養した。培養した後、EDTAを含むPBS(-)溶液を用いてF75培養フラスコから剥がし、適当な密度 ($1.0 \sim 1.5 \times 10^6$ cell/ml) にPBS溶液に懸濁した。その細胞懸濁液をIonWorks HT™ システムの細胞用リザーバーに移した。hERG電流測定の手順としては、測定用プレート (PatchPlate™, Molecular Devices Corp.) の各ウェルにPBSを分注し、次に細胞浮遊液を分注し、ウェルの中央にある穴に細胞がシールを形成するまで放置した。シール形成後、アンフォテリシンBを含む溶液 (KCl 140mM, MgCl₂ 1mM, EGTA 1mM, HEPES 20mM, pH7.25-7.3) を灌流し、穿孔パッチを形成させた。穿孔パッチ形成後、刺激電極を介した膜電位固定法により細胞に電位変化を与え、hERG電流を誘発させ、hERG電流を記録した。

hERG電流は、電位を-80mVから+20mVへ1秒間、続いて-50mVへ1秒間変化させ誘発させた。hERG電流の大きさは、-50mVに電位を戻した際に観察される末尾電流のピーク値を用いた。リポフェクション法でhERG遺伝子を導入した細胞株およびレトロウイルスでhERG遺伝子を導入した細胞株から記録されたhERG電流の分布を図16および表1に示す。

リポフェクション法でhERG遺伝子を導入し樹立した細胞株（実施例16）のhERG電流分布

(表1、図16のA)よりも、レトロウイルスを用いてhERG遺伝子を導入し樹立した細胞(実施例13)の電流分布は大きく(表1、図16のB)、また細胞株(実施例14)の電流分布は明らかに大きかった(表1、図16のC)。

【表1】

A

Amplitude (nA)	0-0.2	0.2-0.4	0.4-0.6	0.6-0.8	0.8-1.0	1.0-1.2	1.2-1.4	1.4-1.6	1.6-1.8	1.8-2.0	2.0-2.2	2.2-2.4	> 2.4	SUM
number	240	21	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	264
ratio (%)	90.9	8.0	0.4	0.4	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0

B

Amplitude (nA)	0-0.2	0.2-0.4	0.4-0.6	0.6-0.8	0.8-1.0	1.0-1.2	1.2-1.4	1.4-1.6	1.6-1.8	1.8-2.0	2.0-2.2	2.2-2.4	> 2.4	SUM
number	12	61	66	48	28	15	16	9	6	5	1	0	1	268
ratio (%)	4.5	22.8	24.6	17.9	10.4	5.6	6.0	3.4	2.2	1.9	0.4	0.0	0.4	100.0

C

Amplitude (nA)	0-0.2	0.2-0.4	0.4-0.6	0.6-0.8	0.8-1.0	1.0-1.2	1.2-1.4	1.4-1.6	1.6-1.8	1.8-2.0	2.0-2.2	2.2-2.4	> 2.4	SUM
number	17	19	27	34	53	48	45	28	25	16	7	6	5	328
ratio (%)	5.2	5.8	8.2	10.4	16.2	14.6	13.7	7.9	7.6	4.9	2.1	1.8	1.5	100.0

表1において、Aは、リポフェクション法によりhERG遺伝子を導入した細胞株、BはレトロウイルスによりhERG遺伝子を導入した細胞、CはレトロウイルスによりhERG遺伝子を導入した細胞株のhERG電流分布を表わす。

【0104】

【実施例20】全自動ハイスループットパッチクランプシステムによる既知化合物のhERGチャネル阻害活性の評価

リポフェクション法でhERG遺伝子を導入した細胞株(実施例16)およびレトロウイルスでhERG遺伝子を導入した細胞株(実施例14)を用いて行った。hERG電流の測定は実施例19と同様に行った。また、既知化合物のhERGチャネルに対する阻害活性は、既知化合物添加前に記録された末尾電流のピーク値を100%とし、各濃度の被検物質を添加した後の末尾電流のピーク値から抑制率を算出した。既知化合物のそれぞれの濃度における抑制率よりhERG電流に対する阻害活性値(IC50値)を算出した。

各薬剤の評価濃度は、アステミゾール、E-4031、リスベリドン、ベラパミルが0.016, 0.048, 0.014, 0.041, 0.123, 0.37, 1.11, 3.33 μ M、キニジンは0.048, 0.014, 0.041, 0.123, 0.37, 1.11, 3.33, 10 μ Mとした。また、薬剤は約4分間作用させた。

その結果、リポフェクション法でhERG遺伝子を導入した細胞株では、殆どのデータポイントが欠落していたが、レトロウイルスでhERG遺伝子を導入した細胞株では、全てのデータを取得でき、各薬剤のIC50値(0.083, 0.044, 0.536, 0.720, 0.385 μ M)も求めることが出来た(図17)。

【0105】

【実施例21】FLIPR Membrane Potential Assay Kitを用いた膜電位変化の測定

レトロウイルスでhERG遺伝子を導入した細胞株(実施例14)を用いて行う。また、FLIPR Membrane Potential Assay Kit (Molecular Devices)、FDSS6000 (浜松ホトニクス社)を用いる。hERGチャネル発現細胞を、測定二日前にBiocoat Poly-D-Lysine 384-Well Black/Clear Plate (BECKTON DICKINSON)に蒔く。細胞溶液は 1.2×10^5 cells/mlの濃度に調製し、1ウェル当たり25 μ lとする。FLIPR Membrane Potential Assay KitのComponent Aを測定用緩衝液(130mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 24mM Glucose, 10mM HEPES、(最終pH約7.25))に溶解し、1ウェル当たり25 μ l加える。Component Aを添加してから約1時間後、FDSS6000を用いて膜電位変化の測定を行う。測定プログラムは、被検物質添加前に10回、添加後に50回、6秒毎とする。測定は室温で行う。hERG阻害活性は、被検物質添加後5分間で変化した蛍光強度から算出する。陽性対照として、E4031、Dofetilideを用いる。

【0106】

【実施例22】古典的パッチクランプ法によるhERG電流の記録

本発明のhERG発現細胞を用いて行った。また、hERG電流の測定を論文 [Zhou, Z et al, Biophysical Journal, 74, 230-241 (1998)]を参考に以下のように行った。

ポリリジンをコーティングしたガラスプレート上に細胞を蒔き、2~4日間培養した。実験時に細胞を蒔いたガラスプレートを電流測定用バスに移動した。hERG電流は、ホールセルパッチクランプ法の膜電位固定法にて観察した。hERG電流の記録用の溶液としては、細胞外灌流溶液 (NaCl 137 mM、KCl 4 mM、MgCl₂ 1 mM、CaCl₂ 1.8 mM、glucose 10 mM、HEPES 10 mM pH7.4) および電極内溶液 (KCl 130 mM、MgCl₂ 1 mM、Mg-ATP 5 mM、EGTA 5 mM、HEPES 10 mM、pH7.2) を用いた。hERG電流の測定には電流増幅装置 (Axon Instruments) を使い、電流の記録および解析にはpCLAMPソフトウェア (Axon Instruments) を使用した。hERG電流は、電位を-80mVから+20mVへ5秒間、そして-50mVへ4秒間変化させ、この電位変化を20秒間隔で細胞に与え誘発した。また、hERG電流の大きさには、-50mVに電位を戻した際に観察される末尾電流のピーク値を用いた。

【産業上の利用可能性】

【0107】

本発明により、薬剤研究開発でのhERGチャネル阻害に基づく副作用を予測するための発現レベルの著しく高いhERGチャネル発現細胞の樹立法を確立し、それにより高感度で処理能力の高い評価を可能とした。

【0108】

本発明により、同時に効率よくhERGチャネルの高発現細胞を得られることを利用して、多様な細胞種に対してhERG遺伝子を高レベルで発現させることにより、各細胞種間で内在性のイオンチャネルの影響を比較することで、薬剤研究開発における副作用予測を行う上で最も適切な細胞種を選択することを可能としている。

【図面の簡単な説明】

【0109】

【図1】 レトロウイルスベクタープラスミド (pBabeXIP) の構造を示す。

【図2】 レトロウイルスベクタープラスミド (pBabeXIH) の構造を示す。

【図3】 レトロウイルスベクタープラスミド (pBabeCLXIP) の構造を示す。

【図4】 レトロウイルスベクタープラスミド (pBabeCLXIH) の構造を示す。

【図5】 レトロウイルスベクタープラスミド (pBabeCLXI2G) の構造を示す。

【図6】 レトロウイルスベクタープラスミド (pBabeCLXaIN) の構造を示す。

【図7】 hERG遺伝子を導入したレトロウイルスベクタープラスミド (pBabeCL(hERG)aIN) の構造を示す。

【図8】 hERG遺伝子を導入したレトロウイルスベクタープラスミド (pBabeCL(hERG)IH) の構造を示す。

【図9】 hERG遺伝子を導入したレトロウイルスベクタープラスミド (pBabeCL(hERG)IP) の構造を示す。

【図10】 hERG遺伝子を導入したレトロウイルスベクタープラスミド (pBabeCL(hERG)I2G) の構造を示す。

【図11】 hERG遺伝子を導入したレトロウイルスベクタープラスミド (pBabeCL(hERG)) の構造を示す。

【図12】 レンチウイルスベクタープラスミド (pLenti6/MCS) の構造を示す。

【図13】 レンチウイルスベクタープラスミド (pLenti6/cPPT-MCS) の構造を示す。

【図14】 hERG遺伝子を導入したレンチウイルスベクタープラスミド (pLenti6/cPPT-hERG) の構造を示す。

【図15】 ウェスタンブロット法によるhERGチャネルタンパクの検出結果を示す。(Lane1: normal CHO-K1細胞、Lane2: リポフェクション法によりhERG遺伝子を導入した細胞株、Lane3: レトロウイルスによりhERG遺伝子を導入した細胞株)

【図16】 hERG電流の分布を表す。(A: リポフェクション法によりhERG遺伝子を導入した細胞株、図B: レトロウイルスによりhERG遺伝子を導入した細胞、図C: レトロ

ウイルスによりhERG遺伝子を導入した細胞株)

【図17】既知化合物のhERG阻害活性を表す。

【配列表フリーテキスト】

【0110】

配列番号3：プライマー
配列番号4：プライマー
配列番号5：プライマー
配列番号6：プライマー
配列番号7：プライマー
配列番号8：プライマー
配列番号9：oligo DNA
配列番号10：oligo DNA
配列番号11：プライマー
配列番号12：プライマー

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Eisai Co., Ltd.

<120> hERG channel-expressing cell

<130> P03-0162

<160> 13

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 4070

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (184)..(3660)

<400> 1

acgcggcctg ctcaggcctc cagcggccgg tcggagggga ggcgggaggc gagcgaggac 60

ccgcgcccgc agtccagtct gtgcgcgccc gtgctcgctt ggcgcggtgc gggaccagcg 120

ccggccaccc gaagcctagt gcgtcgccgg gtgggtgggc ccgcccggcg ccatgggctc 180

agg atg ccg gtg cgg agg ggc cac gtc gcg ccg cag aac acc ttc ctg 228
Met Pro Val Arg Arg Gly His Val Ala Pro Gln Asn Thr Phe Leu
1 5 10 15gac acc atc atc cgc aag ttt gag ggc cag agc cgt aag ttc atc atc 276
Asp Thr Ile Ile Arg Lys Phe Glu Gly Gln Ser Arg Lys Phe Ile Ile
20 25 30gcc aac gct cgg gtg gag aac tgc gcc gtc atc tac tgc aac gac ggc 324
Ala Asn Ala Arg Val Glu Asn Cys Ala Val Ile Tyr Cys Asn Asp Gly
35 40 45ttc tgc gag ctg tgc ggc tac tcg cgg gcc gag gtg atg cag cga ccc 372
Phe Cys Glu Leu Cys Gly Tyr Ser Arg Ala Glu Val Met Gln Arg Pro
50 55 60tgc acc tgc gac ttc ctg cac ggg ccg cgc acg cag cgc cgc gct gcc 420
Cys Thr Cys Asp Phe Leu His Gly Pro Arg Thr Gln Arg Arg Ala Ala
65 70 75

gcg cag atc gcg cag gca ctg ctg ggc gcc gag gag cgc aaa gtg gaa Ala Gln Ile Ala Gln Ala Leu Leu Gly Ala Glu Glu Arg Lys Val Glu 80 85 90 95	468
atc gcc ttc tac cgg aaa gat ggg agc tgc ttc cta tgt ctg gtg gat Ile Ala Phe Tyr Arg Lys Asp Gly Ser Cys Phe Leu Cys Leu Val Asp 100 105 110	516
gtg gtg ccc gtg aag aac gag gat ggg gct gtc atc atg ttc atc ctc Val Val Pro Val Lys Asn Glu Asp Gly Ala Val Ile Met Phe Ile Leu 115 120 125	564
aat ttc gag gtg gtg atg gag aag gac atg gtg ggg tcc ccg gct cat Asn Phe Glu Val Val Met Glu Lys Asp Met Val Gly Ser Pro Ala His 130 135 140	612
gac acc aac cac cgg ggc ccc ccc acc agc tgg ctg gcc cca ggc cgc Asp Thr Asn His Arg Gly Pro Pro Thr Ser Trp Leu Ala Pro Gly Arg 145 150 155	660
gcc aag acc ttc cgc ctg aag ctg ccc gcg ctg ctg gcg ctg acg gcc Ala Lys Thr Phe Arg Leu Lys Leu Pro Ala Leu Leu Ala Leu Thr Ala 160 165 170 175	708
cgg gag tcg tcg gtg cgg tcg ggc ggc gcg ggc ggc gcg ggc gcc ccg Arg Glu Ser Ser Val Arg Ser Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Pro 180 185 190	756
ggg gcc gtg gtg gtg gac gtg gac ctg acg ccc gcg gca ccc agc agc Gly Ala Val Val Val Asp Val Asp Leu Thr Pro Ala Ala Pro Ser Ser 195 200 205	804
gag tcg ctg gcc ctg gac gaa gtg aca gcc atg gac aac cac gtg gca Glu Ser Leu Ala Leu Asp Glu Val Thr Ala Met Asp Asn His Val Ala 210 215 220	852
ggg ctc ggg ccc gcg gag gag cgg cgt gcg ctg gtg ggt ccc ggc tct Gly Leu Gly Pro Ala Glu Glu Arg Arg Ala Leu Val Gly Pro Gly Ser 225 230 235	900
ccg ccc cgc agc gcg ccc ggc cag ctc cca tcg ccc cgg gcg cac agc Pro Pro Arg Ser Ala Pro Gly Gln Leu Pro Ser Pro Arg Ala His Ser 240 245 250 255	948
ctc aac ccc gac gcc tcg ggc tcc agc tgc agc ctg gcc cgg acg cgc Leu Asn Pro Asp Ala Ser Gly Ser Ser Cys Ser Leu Ala Arg Thr Arg 260 265 270	996
tcc cga gaa agc tgc gcc agc gtg gcg gcg gcc tcg tcg gcc gac gac Ser Arg Glu Ser Cys Ala Ser Val Arg Arg Ala Ser Ser Ala Asp Asp 1044	

275	280	285	
atc gag gcc atg cgc gcc ggg gtg ctg ccc ccg cca ccg cgc cac gcc Ile Glu Ala Met Arg Ala Gly Val Leu Pro Pro Pro Arg His Ala 290 295 300	1092		
agc acc ggg gcc atg cac cca ctg cgc agc ggc ttg ctc aac tcc acc Ser Thr Gly Ala Met His Pro Leu Arg Ser Gly Leu Leu Asn Ser Thr 305 310 315	1140		
tcg gac tcc gac ctc gtg cgc tac cgc acc att agc aag att ccc caa Ser Asp Ser Asp Leu Val Arg Tyr Arg Thr Ile Ser Lys Ile Pro Gln 320 325 330 335	1188		
atc acc ctc aac ttt gtg gac ctc aag ggc gac ccc ttc ttg gct tcg Ile Thr Leu Asn Phe Val Asp Leu Lys Gly Asp Pro Phe Leu Ala Ser 340 345 350	1236		
ccc acc agt gac cgt gag atc ata gca cct aag ata aag gag cga acc Pro Thr Ser Asp Arg Glu Ile Ile Ala Pro Lys Ile Lys Glu Arg Thr 355 360 365	1284		
cac aat gtc act gag aag gtc acc cag gtc ctg tcc ctg ggc gcc gac His Asn Val Thr Glu Lys Val Thr Gln Val Leu Ser Leu Gly Ala Asp 370 375 380	1332		
gtg ctg cct gag tac aag ctg cag gca ccg cgc atc cac cgc tgg acc Val Leu Pro Glu Tyr Lys Leu Gln Ala Pro Arg Ile His Arg Trp Thr 385 390 395	1380		
atc ctg cat tac agc ccc ttc aag gcc gtg tgg gac tgg ctc atc ctg Ile Leu His Tyr Ser Pro Phe Lys Ala Val Trp Asp Trp Leu Ile Leu 400 405 410 415	1428		
ctg ctg gtc atc tac acg gct gtc ttc aca ccc tac tcg gct gcc ttc Leu Leu Val Ile Tyr Thr Ala Val Phe Thr Pro Tyr Ser Ala Ala Phe 420 425 430	1476		
ctg ctg aag gag acg gaa gaa ggc ccg cct gct acc gag tgt ggc tac Leu Leu Lys Glu Thr Glu Glu Gly Pro Pro Ala Thr Glu Cys Gly Tyr 435 440 445	1524		
gcc tgc cag ccg ctg gct gtg gtg gac ctc atc gtg gac atc atg ttc Ala Cys Gln Pro Leu Ala Val Val Asp Leu Ile Val Asp Ile Met Phe 450 455 460	1572		
att gtg gac atc ctc atc aac ttc cgc acc acc tac gtc aat gcc aac Ile Val Asp Ile Leu Ile Asn Phe Arg Thr Thr Tyr Val Asn Ala Asn 465 470 475	1620		

gag gag gtg gtc agc cac ccc ggc cgc atc gcc gtc cac tac ttc aag Glu Glu Val Val Ser His Pro Gly Arg Ile Ala Val His Tyr Phe Lys 480 485 490 495	1668
ggc tgg ttc ctc atc gac atg gtg gcc gcc atc ccc ttc gac ctg ctc Gly Trp Phe Leu Ile Asp Met Val Ala Ala Ile Pro Phe Asp Leu Leu 500 505 510	1716
atc ttc ggc tct ggc tct gag gag ctg atc ggg ctg ctg aag act gcg Ile Phe Gly Ser Gly Ser Glu Glu Leu Ile Gly Leu Leu Lys Thr Ala 515 520 525	1764
cgg ctg ctg cgg ctg gtg cgc gtg gcg cgg aag ctg gat cgc tac tca Arg Leu Leu Arg Leu Val Arg Val Ala Arg Lys Leu Asp Arg Tyr Ser 530 535 540	1812
gag tac ggc gcg gcc gtg ctg ttc ttg ctc atg tgc acc ttt gcg ctc Glu Tyr Gly Ala Ala Val Leu Phe Leu Leu Met Cys Thr Phe Ala Leu 545 550 555	1860
atc gcg cac tgg cta gcc tgc atc tgg tac gcc atc ggc aac atg gag Ile Ala His Trp Leu Ala Cys Ile Trp Tyr Ala Ile Gly Asn Met Glu 560 565 570 575	1908
cag cca cac atg gac tca cgc atc ggc tgg ctg cac aac ctg ggc gac Gln Pro His Met Asp Ser Arg Ile Gly Trp Leu His Asn Leu Gly Asp 580 585 590	1956
cag ata ggc aaa ccc tac aac agc agc ggc ctg ggc ggc ccc tcc atc Gln Ile Gly Lys Pro Tyr Asn Ser Ser Gly Leu Gly Gly Pro Ser Ile 595 600 605	2004
aag gac aag tat gtg acg gcg ctc tac ttc acc ttc agc agc ctc acc Lys Asp Lys Tyr Val Thr Ala Leu Tyr Phe Thr Phe Ser Ser Leu Thr 610 615 620	2052
agt gtg ggc ttc ggc aac gtc tct ccc aac acc aac tca gag aag atc Ser Val Gly Phe Gly Asn Val Ser Pro Asn Thr Asn Ser Glu Lys Ile 625 630 635	2100
ttc tcc atc tgc gtc atg ctc att ggc tcc ctc atg tat gct agc atc Phe Ser Ile Cys Val Met Leu Ile Gly Ser Leu Met Tyr Ala Ser Ile 640 645 650 655	2148
ttc ggc aac gtg tcg gcc atc atc cag cgg ctg tac tcg ggc aca gcc Phe Gly Asn Val Ser Ala Ile Ile Gln Arg Leu Tyr Ser Gly Thr Ala 660 665 670	2196
cgc tac cac aca cag atg ctg cgg gtg cgg gag ttc atc cgc ttc cac Arg Tyr His Thr Gln Met Leu Arg Val Arg Glu Phe Ile Arg Phe His	2244

675	680	685	
cag atc ccc aat ccc ctg cgc cag cgc ctc gag gag tac ttc cag cac Gln Ile Pro Asn Pro Leu Arg Gln Arg Leu Glu Glu Tyr Phe Gln His 690 695 700			2292
gcc tgg tcc tac acc aac ggc atc gac atg aac gcg gtg ctg aag ggc Ala Trp Ser Tyr Thr Asn Gly Ile Asp Met Asn Ala Val Leu Lys Gly 705 710 715			2340
ttc cct gag tgc ctg cag gct gac atc tgc ctg cac ctg aac cgc tca Phe Pro Glu Cys Leu Gln Ala Asp Ile Cys Leu His Leu Asn Arg Ser 720 725 730 735			2388
ctg ctg cag cac tgc aaa ccc ttc cga ggg gcc acc aag ggc tgc ctt Leu Leu Gln His Cys Lys Pro Phe Arg Gly Ala Thr Lys Gly Cys Leu 740 745 750			2436
cgg gcc ctg gcc atg aag ttc aag acc aca cat gca ccg cca ggg gac Arg Ala Leu Ala Met Lys Phe Lys Thr Thr His Ala Pro Pro Gly Asp 755 760 765			2484
aca ctg gtg cat gct ggg gac ctg ctc acc gcc ctg tac ttc atc tcc Thr Leu Val His Ala Gly Asp Leu Leu Thr Ala Leu Tyr Phe Ile Ser 770 775 780			2532
cgg ggc tcc atc gag atc ctg cgg ggc gac gtc gtc gtg gcc atc ctg Arg Gly Ser Ile Glu Ile Leu Arg Gly Asp Val Val Val Ala Ile Leu 785 790 795			2580
ggg aag aat gac atc ttt ggg gag cct ctg aac ctg tat gca agg cct Gly Lys Asn Asp Ile Phe Gly Glu Pro Leu Asn Leu Tyr Ala Arg Pro 800 805 810 815			2628
ggc aag tcg aac ggg gat gtg cgg gcc ctc acc tac tgt gac cta cac Gly Lys Ser Asn Gly Asp Val Arg Ala Leu Thr Tyr Cys Asp Leu His 820 825 830			2676
aag atc cat cgg gac gac ctg ctg gag gtg ctg gac atg tac cct gag Lys Ile His Arg Asp Asp Leu Leu Glu Val Leu Asp Met Tyr Pro Glu 835 840 845			2724
ttc tcc gac cac ttc tgg tcc agc ctg gag atc acc ttc aac ctg cga Phe Ser Asp His Phe Trp Ser Ser Leu Glu Ile Thr Phe Asn Leu Arg 850 855 860			2772
gat acc aac atg atc ccg ggc tcc ccc ggc agt acg gag tta gag ggt Asp Thr Asn Met Ile Pro Gly Ser Pro Gly Ser Thr Glu Leu Glu Gly 865 870 875			2820

ggc ttc agt cgg caa cgc aag cgc aag ttg tcc ttc cgc agg cgc acg Gly Phe Ser Arg Gln Arg Lys Arg Lys Leu Ser Phe Arg Arg Arg Thr 880 885 890 895	2868
gac aag gac acg gag cag cca ggg gag gtg tgc gcc ttg ggg ccg ggc Asp Lys Asp Thr Glu Gln Pro Gly Glu Val Ser Ala Leu Gly Pro Gly 900 905 910	2916
cgg gcg ggg gca ggg ccg agt agc cgg ggc cgg ccg ggg ggg ccg tgg Arg Ala Gly Ala Gly Pro Ser Ser Arg Gly Arg Pro Gly Gly Pro Trp 915 920 925	2964
ggg gag agc ccg tcc agt ggc ccc tcc agc cct gag agc agt gag gat Gly Glu Ser Pro Ser Ser Gly Pro Ser Ser Pro Glu Ser Ser Glu Asp 930 935 940	3012
gag ggc cca ggc cgc agc tcc agc ccc ctc cgc ctg gtg ccc ttc tcc Glu Gly Pro Gly Arg Ser Ser Ser Pro Leu Arg Leu Val Pro Phe Ser 945 950 955	3060
agc ccc agg ccc ccc gga gag ccg ccg ggt ggg gag ccc ctg atg gag Ser Pro Arg Pro Pro Gly Glu Pro Pro Gly Gly Glu Pro Leu Met Glu 960 965 970 975	3108
gac tgc gag aag agc agc gac act tgc aac ccc ctg tca ggc gcc ttc Asp Cys Glu Lys Ser Ser Asp Thr Cys Asn Pro Leu Ser Gly Ala Phe 980 985 990	3156
tca gga gtg tcc aac att ttc agc ttc tgg ggg gac agt cgg ggc cgc Ser Gly Val Ser Asn Ile Phe Ser Phe Trp Gly Asp Ser Arg Gly Arg 995 1000 1005	3204
cag tac cag gag ctc cct cga tgc ccc gcc ccc acc ccc agc ctc Gln Tyr Gln Glu Leu Pro Arg Cys Pro Ala Pro Thr Pro Ser Leu 1010 1015 1020	3249
ctc aac atc ccc ctc tcc agc ccg ggt cgg cgg ccc cgg ggc gac Leu Asn Ile Pro Leu Ser Ser Pro Gly Arg Arg Pro Arg Gly Asp 1025 1030 1035	3294
gtg gag agc agg ctg gat gcc ctc cag cgc cag ctc aac agg ctg Val Glu Ser Arg Leu Asp Ala Leu Gln Arg Gln Leu Asn Arg Leu 1040 1045 1050	3339
gag acc cgg ctg agt gca gac atg gcc act gtc ctg cag ctg cta Glu Thr Arg Leu Ser Ala Asp Met Ala Thr Val Leu Gln Leu Leu 1055 1060 1065	3384
cag agg cag atg acg ctg gtc ccg ccc gcc tac agt gct gtg acc Gln Arg Gln Met Thr Leu Val Pro Pro Ala Tyr Ser Ala Val Thr	3429

1070	1075	1080	
acc ccg ggg cct ggc ccc act tcc	aca tcc ccg ctg ttg	ccc gtc	3474
Thr Pro Gly Pro Gly Pro Thr Ser	Thr Ser Pro Leu Leu	Pro Val	
1085	1090	1095	
agc ccc ctc ccc acc ctc acc ttg	gac tcg ctt tct cag	gtt tcc	3519
Ser Pro Leu Pro Thr Leu Thr Leu	Asp Ser Leu Ser Gln	Val Ser	
1100	1105	1110	
cag ttc atg gcg tgt gag gag ctg	ccc ccg ggg gcc cca	gag ctt	3564
Gln Phe Met Ala Cys Glu Glu Leu	Pro Pro Gly Ala Pro	Glu Leu	
1115	1120	1125	
ccc caa gaa ggc ccc aca cga cgc	ctc tcc cta ccg ggc	cag ctg	3609
Pro Gln Glu Gly Pro Thr Arg Arg	Leu Ser Leu Pro Gly	Gln Leu	
1130	1135	1140	
ggg gcc ctc acc tcc cag ccc ctg	cac aga cac ggc tcg	gac ccg	3654
Gly Ala Leu Thr Ser Gln Pro Leu	His Arg His Gly Ser	Asp Pro	
1145	1150	1155	
ggc agt tagtggggct gcccagtgtg	gacacgtggc tcacccaggg	atcaaggcgc	3710
Gly Ser			
tgctggggccg ctccccttgg aggccctgct	caggaggccc tgaccgtgga	aggggagagg	3770
aactcgaaag cacagctcct cccccagccc	ttgggaccat cttctcctgc	agtcccctgg	3830
gccccagtga gaggggcagg ggcagggccg	gcagtaggtg gggcctgtgg	tccccccact	3890
gccctgaggg cattagctgg tctaactgcc	cggaggcacc cggccctggg	ccttaggcac	3950
ctcaaggact tttctgctat ttactgctct	tattgttaag gataataatt	aaggatcata	4010
tgaataatta atgaagatgc tgatgactat	gaataataaa taattatcct	gaggagaaaa	4070

<210> 2
 <211> 1159
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 2

Met	Pro	Val	Arg	Arg	Gly	His	Val	Ala	Pro	Gln	Asn	Thr	Phe	Leu	Asp
1				5				10						15	

Thr Ile Ile Arg Lys Phe Glu Gly Gln Ser Arg Lys Phe Ile Ile Ala
20 25 30

Asn Ala Arg Val Glu Asn Cys Ala Val Ile Tyr Cys Asn Asp Gly Phe
35 40 45

Cys Glu Leu Cys Gly Tyr Ser Arg Ala Glu Val Met Gln Arg Pro Cys
50 55 60

Thr Cys Asp Phe Leu His Gly Pro Arg Thr Gln Arg Arg Ala Ala Ala
65 70 75 80

Gln Ile Ala Gln Ala Leu Leu Gly Ala Glu Glu Arg Lys Val Glu Ile
85 90 95

Ala Phe Tyr Arg Lys Asp Gly Ser Cys Phe Leu Cys Leu Val Asp Val
100 105 110

Val Pro Val Lys Asn Glu Asp Gly Ala Val Ile Met Phe Ile Leu Asn
115 120 125

Phe Glu Val Val Met Glu Lys Asp Met Val Gly Ser Pro Ala His Asp
130 135 140

Thr Asn His Arg Gly Pro Pro Thr Ser Trp Leu Ala Pro Gly Arg Ala
145 150 155 160

Lys Thr Phe Arg Leu Lys Leu Pro Ala Leu Leu Ala Leu Thr Ala Arg
165 170 175

Glu Ser Ser Val Arg Ser Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Pro Gly
180 185 190

Ala Val Val Val Asp Val Asp Leu Thr Pro Ala Ala Pro Ser Ser Glu
195 200 205

Ser Leu Ala Leu Asp Glu Val Thr Ala Met Asp Asn His Val Ala Gly
210 215 220

Leu Gly Pro Ala Glu Glu Arg Arg Ala Leu Val Gly Pro Gly Ser Pro
225 230 235 240

Pro Arg Ser Ala Pro Gly Gln Leu Pro Ser Pro Arg Ala His Ser Leu
245 250 255

Asn Pro Asp Ala Ser Gly Ser Ser Cys Ser Leu Ala Arg Thr Arg Ser
260 265 270

Arg Glu Ser Cys Ala Ser Val Arg Arg Ala Ser Ser Ala Asp Asp Ile
275 280 285

Glu Ala Met Arg Ala Gly Val Leu Pro Pro Pro Pro Arg His Ala Ser
290 295 300

Thr Gly Ala Met His Pro Leu Arg Ser Gly Leu Leu Asn Ser Thr Ser
305 310 315 320

Asp Ser Asp Leu Val Arg Tyr Arg Thr Ile Ser Lys Ile Pro Gln Ile
325 330 335

Thr Leu Asn Phe Val Asp Leu Lys Gly Asp Pro Phe Leu Ala Ser Pro
340 345 350

Thr Ser Asp Arg Glu Ile Ile Ala Pro Lys Ile Lys Glu Arg Thr His
355 360 365

Asn Val Thr Glu Lys Val Thr Gln Val Leu Ser Leu Gly Ala Asp Val
370 375 380

Leu Pro Glu Tyr Lys Leu Gln Ala Pro Arg Ile His Arg Trp Thr Ile
385 390 395 400

Leu His Tyr Ser Pro Phe Lys Ala Val Trp Asp Trp Leu Ile Leu Leu
405 410 415

Leu Val Ile Tyr Thr Ala Val Phe Thr Pro Tyr Ser Ala Ala Phe Leu
420 425 430

Leu Lys Glu Thr Glu Glu Gly Pro Pro Ala Thr Glu Cys Gly Tyr Ala
435 440 445

Cys Gln Pro Leu Ala Val Val Asp Leu Ile Val Asp Ile Met Phe Ile
450 455 460

Val Asp Ile Leu Ile Asn Phe Arg Thr Thr Tyr Val Asn Ala Asn Glu
465 470 475 480

Glu Val Val Ser His Pro Gly Arg Ile Ala Val His Tyr Phe Lys Gly
485 490 495

Trp Phe Leu Ile Asp Met Val Ala Ala Ile Pro Phe Asp Leu Leu Ile
500 505 510

Phe Gly Ser Gly Ser Glu Glu Leu Ile Gly Leu Leu Lys Thr Ala Arg
515 520 525

Leu Leu Arg Leu Val Arg Val Ala Arg Lys Leu Asp Arg Tyr Ser Glu
530 535 540

Tyr Gly Ala Ala Val Leu Phe Leu Leu Met Cys Thr Phe Ala Leu Ile
545 550 555 560

Ala His Trp Leu Ala Cys Ile Trp Tyr Ala Ile Gly Asn Met Glu Gln
565 570 575

Pro His Met Asp Ser Arg Ile Gly Trp Leu His Asn Leu Gly Asp Gln
580 585 590

Ile Gly Lys Pro Tyr Asn Ser Ser Gly Leu Gly Gly Pro Ser Ile Lys
595 600 605

Asp Lys Tyr Val Thr Ala Leu Tyr Phe Thr Phe Ser Ser Leu Thr Ser
610 615 620

Val Gly Phe Gly Asn Val Ser Pro Asn Thr Asn Ser Glu Lys Ile Phe
625 630 635 640

Ser Ile Cys Val Met Leu Ile Gly Ser Leu Met Tyr Ala Ser Ile Phe
645 650 655

Gly Asn Val Ser Ala Ile Ile Gln Arg Leu Tyr Ser Gly Thr Ala Arg
660 665 670

Tyr His Thr Gln Met Leu Arg Val Arg Glu Phe Ile Arg Phe His Gln
675 680 685

Ile Pro Asn Pro Leu Arg Gln Arg Leu Glu Glu Tyr Phe Gln His Ala
690 695 700

Trp Ser Tyr Thr Asn Gly Ile Asp Met Asn Ala Val Leu Lys Gly Phe
705 710 715 720

Pro Glu Cys Leu Gln Ala Asp Ile Cys Leu His Leu Asn Arg Ser Leu
725 730 735

Leu Gln His Cys Lys Pro Phe Arg Gly Ala Thr Lys Gly Cys Leu Arg
740 745 750

Ala Leu Ala Met Lys Phe Lys Thr Thr His Ala Pro Pro Gly Asp Thr
755 760 765

Leu Val His Ala Gly Asp Leu Leu Thr Ala Leu Tyr Phe Ile Ser Arg
770 775 780

Gly Ser Ile Glu Ile Leu Arg Gly Asp Val Val Val Ala Ile Leu Gly
785 790 795 800

Lys Asn Asp Ile Phe Gly Glu Pro Leu Asn Leu Tyr Ala Arg Pro Gly
805 810 815

Lys Ser Asn Gly Asp Val Arg Ala Leu Thr Tyr Cys Asp Leu His Lys
 820 825 830

Ile His Arg Asp Asp Leu Leu Glu Val Leu Asp Met Tyr Pro Glu Phe
 835 840 845

Ser Asp His Phe Trp Ser Ser Leu Glu Ile Thr Phe Asn Leu Arg Asp
 850 855 860

Thr Asn Met Ile Pro Gly Ser Pro Gly Ser Thr Glu Leu Glu Gly Gly
 865 870 875 880

Phe Ser Arg Gln Arg Lys Arg Lys Leu Ser Phe Arg Arg Arg Thr Asp
 885 890 895

Lys Asp Thr Glu Gln Pro Gly Glu Val Ser Ala Leu Gly Pro Gly Arg
 900 905 910

Ala Gly Ala Gly Pro Ser Ser Arg Gly Arg Pro Gly Gly Pro Trp Gly
 915 920 925

Glu Ser Pro Ser Ser Gly Pro Ser Ser Pro Glu Ser Ser Glu Asp Glu
 930 935 940

Gly Pro Gly Arg Ser Ser Ser Pro Leu Arg Leu Val Pro Phe Ser Ser
 945 950 955 960

Pro Arg Pro Pro Gly Glu Pro Pro Gly Gly Glu Pro Leu Met Glu Asp
 965 970 975

Cys Glu Lys Ser Ser Asp Thr Cys Asn Pro Leu Ser Gly Ala Phe Ser
 980 985 990

Gly Val Ser Asn Ile Phe Ser Phe Trp Gly Asp Ser Arg Gly Arg Gln
 995 1000 1005

Tyr Gln Glu Leu Pro Arg Cys Pro Ala Pro Thr Pro Ser Leu Leu
 1010 1015 1020

Asn Ile Pro Leu Ser Ser Pro Gly Arg Arg Pro Arg Gly Asp Val
1025 1030 1035

Glu Ser Arg Leu Asp Ala Leu Gln Arg Gln Leu Asn Arg Leu Glu
1040 1045 1050

Thr Arg Leu Ser Ala Asp Met Ala Thr Val Leu Gln Leu Leu Gln
1055 1060 1065

Arg Gln Met Thr Leu Val Pro Pro Ala Tyr Ser Ala Val Thr Thr
1070 1075 1080

Pro Gly Pro Gly Pro Thr Ser Thr Ser Pro Leu Leu Pro Val Ser
1085 1090 1095

Pro Leu Pro Thr Leu Thr Leu Asp Ser Leu Ser Gln Val Ser Gln
1100 1105 1110

Phe Met Ala Cys Glu Glu Leu Pro Pro Gly Ala Pro Glu Leu Pro
1115 1120 1125

Gln Glu Gly Pro Thr Arg Arg Leu Ser Leu Pro Gly Gln Leu Gly
1130 1135 1140

Ala Leu Thr Ser Gln Pro Leu His Arg His Gly Ser Asp Pro Gly
1145 1150 1155

Ser

<210> 3

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 3
aatgtgtacc atgggctcag gatgccgtg c

31

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 4
gcttgactc aggcagcacg t

21

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 5
ccaccagtga ccgtgagatc a

21

<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 6
ttgcagtgct gcagcagtga g

21

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 7
atgctagcat cttcggcaac g

21

<210> 8
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 8
aattaagctt tticgagttc ctctcccctt c

31

<210> 9
<211> 52
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligo DNA

<400> 9
gatcccccg gctgcaggaa ttcatatcg ttaacgtcga cctcgagggt ac

52

<210> 10
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligo DNA

<400> 10
cctcgaggtc gacgttaacg atatcgaatt cctgcagccc gggg

44

<210> 11
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 11
gtcgtcatcg atacaaatgg cagtattcat cc

32

<210> 12
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 12
gtcgtcaagc ttccaaactg gatctctgct gtcc 34

<210> 13
<211> 5020
<212> DNA
<213> Retroviral provirus

<400> 13
ctgcagcctg aatatgggcc aaacaggata tctgtggtaa gcagttcctg ccccggtca 60
gggccaagaa cagatggaac agctgaatat gggccaaaca ggatatctgt ggtaagcagt 120
tcctgccccg gctcagggcc aagaacagat ggtccccaga tgcggtccag ccctcagcag 180
tttctagaga accatcagat gtttccaggg tgccccaagg acctgaaatg accctgtgcc 240
ttatttgaac taaccaatca gttcgcttct cgcttctgtt cgcgcgcttc tgctccccga 300
gctcaataaa agagcccaca acccctcact cggggcgcca gtcctccgat tgactgagtc 360
gcccgggtac ccgtgtatcc aataaacct ctigcagttg catccgactt gtggtctcgc 420
tgttccttgg gagggctctc tctgagtgat tgactaccg tcagcggggg tctttcattt 480
gggggctcgt cggggatcgg gagaccctg cccagggacc accgaccac caccgggagg 540
taagctggcc agcaacttat ctgtgtctgt ccgattgtct agtgtctatg actgatttta 600
tgcgctgcg tcggtactag ttagctaact agctctgtat ctggcggacc cgtggtggaa 660
ctgacgagtt ctgaacaccc ggccgcaacc ctgggagacg tcccagggaac tttgggggcc 720
gtttttgtgg cccgacctga ggaagggagt cgatgtggaa tccgaccccg tcaggatatg 780
tggttctggt aggagacgag aacctaaaac agttcccgc tccgtctgaa tttttgcttt 840
cggtttggaa ccgaagccgc gcgtcttgtc tgctgcagca tcgttctgtg ttgtctctgt 900
ctgactgtgt ttctgtattt gtctgaaaat tagggccaga ctgttaccac tcccttaagt 960

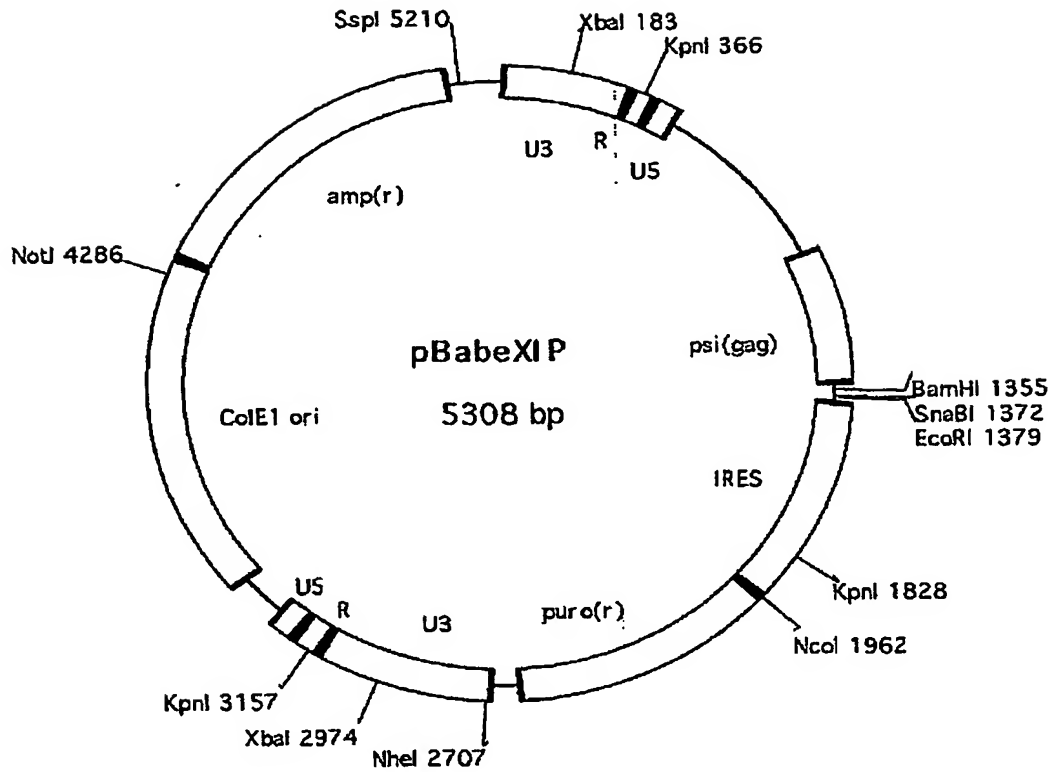
ttgaccttag atcactggaa agatgtcgag cggctcgctc acaaccagtc ggtagatgtc 1020
aagaagagac gttgggttac cttctgctct gcagaatggc caacctttaa cgtcggatgg 1080
ccgcgagacg gcacctttaa ccgagacctc atcaccaggg ttaagatcaa ggtcttttca 1140
cctggcccgc atggacaccc agaccaggtc ccctacatcg tgacctggga agccttggct 1200
tttgaccccc ctccctgggt caagcccttt gtacacccta agcctccgcc tcctcttctt 1260
ccatccgcgc cgtctctccc ccttgaacct cctctttcga cccgcctca atcctccctt 1320
tatccagccc tcactccttc tctaggcgcc ggccggatcc cagtgtggtg gtacgtagga 1380
attcgccagc acagtggtcg acctgtggaa tgtgtgtcag ttaggggtgtg gaaagtcccc 1440
aggctcccca gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatttc aattagtcag caaccagggtg 1500
tgaaaagtcc ccaggctccc cagcaggcag aagtatgcaa agcatgcac tcaattagtc 1560
agcaaccata gtcccgcccc taactccgcc catcccgccc ctaactccgc ccagttccgc 1620
ccattctccg ccccatgggt gactaatttt ttttatattat gcagaggccg aggccgcctc 1680
ggcctctgag ctattccaga agtagtgagg aggctttttt ggaggcctag gcttttgcaa 1740
acgctgcttg aggctgaagg tgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac 1800
gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga 1860
taccaggcgt ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt 1920
accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca tagctcacgc 1980
tgtaggtatc tcagttcggg ttaggtcggt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaaccc 2040
cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta 2100
agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgagggtat 2160
gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaaggaca 2220
gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct 2280
tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtgggtttt ttgtttgcaa gcagcagatt 2340
acgatcgata aaataaaaaga ttttatattag tctccagaaa aaggggggaa tgaaagaccc 2400
cacctgtagg tttggcaagc tagcttaagt aacgccatit tgcaaggcat ggaaaaatac 2460

ataactgaga atagagaagt tcagatcaag gtcaggaaca gatggaacag ctgaatatgg 2520
gccaaacagg atatctgtgg taagcagttc ctgccccggc tcagggccaa gaacagatgg 2580
aacagctgaa tatgggccaa acaggatatc tgtggtaagc agttcctgcc ccggctcagg 2640
gccaagaaca gatggtcccc agatgcggtc cagccctcag cagtttctag agaaccatca 2700
gatgtttcca ggggtgcccc aggacctgaa atgaccctgt gccttatttg aactaaccaa 2760
tcagttcgct tctcgcttct gttcgcgcgc ttctgctccc cgagctcaat aaaagagccc 2820
acaaccctc actcggggcg ccagtcctcc gattgactga gtcgcccggg taccctgtga 2880
tccaataaac cctcttgagc ttgcatccga cttgtggtct cgctgttcct tgggagggtc 2940
tcctctgagt gattgactac ccgtcagcgg gggcttttca catgcagcat gtatcaaaat 3000
taatttgggt ttttttcita agtatttaca ttaaattggc atagttgcat taatgaatcg 3060
gccaacgcgc ggggagaggc gggttgcgta ttgggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg 3120
actcgctgcg ctcggtcgtt cggctgcggc gagcgggtatc agctcactca aaggcggtaa 3180
tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc 3240
aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcggt tttccatagg ctccgcccc 3300
ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagagggt gcgaaacccg acaggactat 3360
aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgctgc ctctcctgtt ccgaccctgc 3420
cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct 3480
cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg 3540
aacccccgt tcagcccgac cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc 3600
cggtaagaca cgacttatcg cactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga 3660
ggtatgtagg cgggtgctaca gagttcttga agtggtggcc taactacggc tacactagaa 3720
ggacagtatt tggatatctgc gctctgctga agccagttac cttcggaaaa agagttggta 3780
gctcttgatc cggcaaacaa accaccgctg gtagcgggtg ttttttgggt tgcaagcagc 3840
agattacgcg cagaaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatcttttct acgggggtctg 3900
acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttgggt catgagatta tcaaaaagga 3960

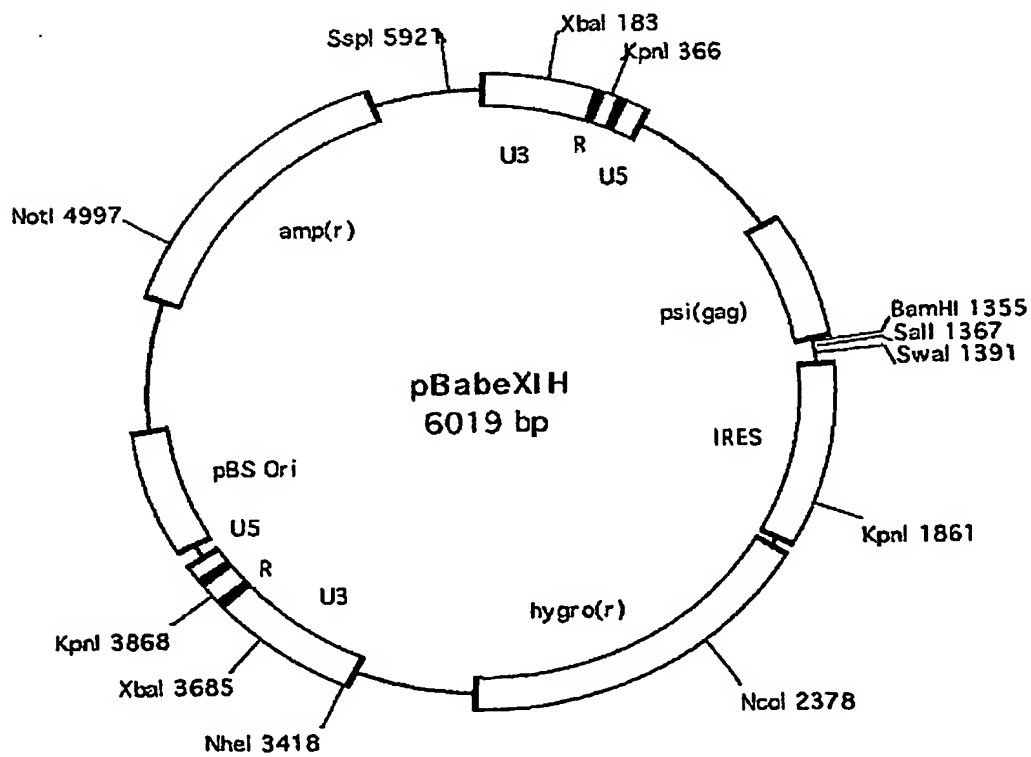
tcttcaccta gatccttita aattaanaaat gaagttitgcg gccgcaaadc aatctaaagt 4020
atatatgagt aaacttggtc tgacagttae caatgcttaa tcagtgaaggc acctatctca 4080
gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg 4140
atacgggagg gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca 4200
ccggctccag atttatcagc aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggc 4260
cctgcaactt tatccgcctc catccagtct attaatgtt gccgggaagc tagagtaagt 4320
agttcgccag ttaatagttt gcgcaacgtt gttgccattg ctacaggcat cgtgggtgtca 4380
cgctcgtcgt ttggtatggc ttcatcagc tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca 4440
tgatcccca tggtgtgcaa aaaagcgggt agctccttcg gtcctccgat cgttgtcaga 4500
agtaagttgg ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact 4560
gtcatgccat ccgtaagatg cttttctgtg actgggtgagt actcaaccaa gtcattctga 4620
gaatagtgtg tgccggcgacc gagttgctct tgcccggcgt caacacggga taataccgcg 4680
ccacatagca gaactttaaa agtgctcatc attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc 4740
tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac cactcgtgc acccaactga 4800
tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat 4860
gccgcaaaaa agggaataag ggcgacacgg aaatgttgaa tactcatact cttccttttt 4920
caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt 4980
atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc 5020

【書類名】 図面

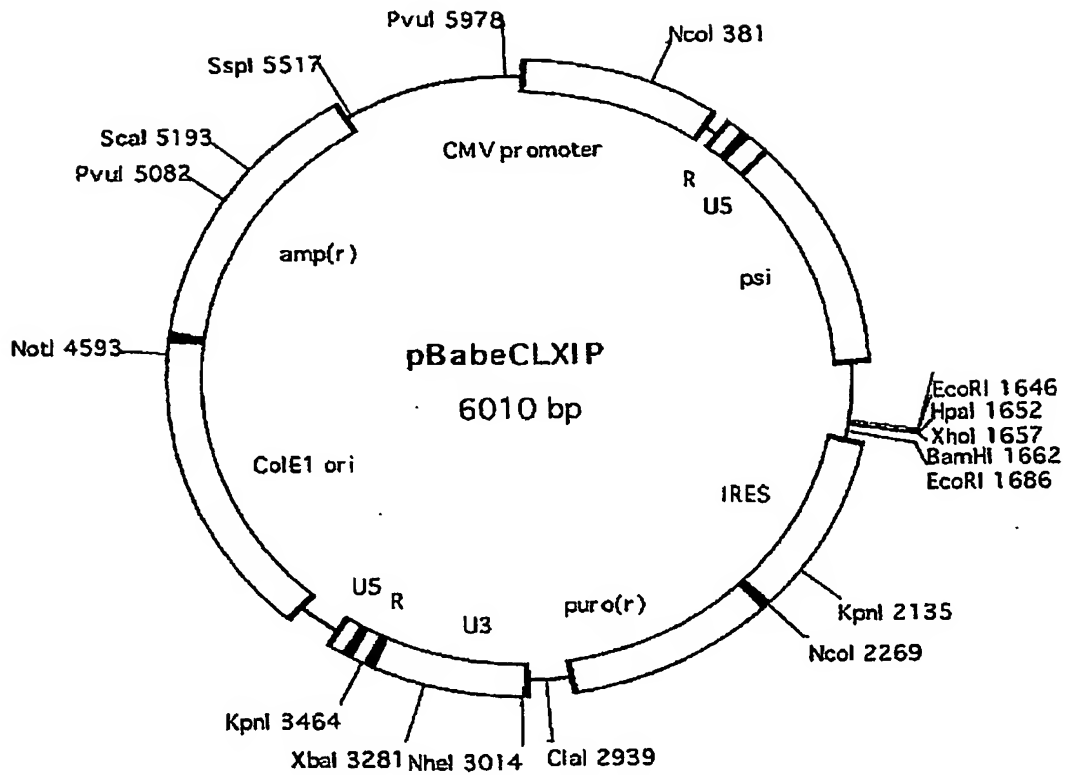
【図 1】



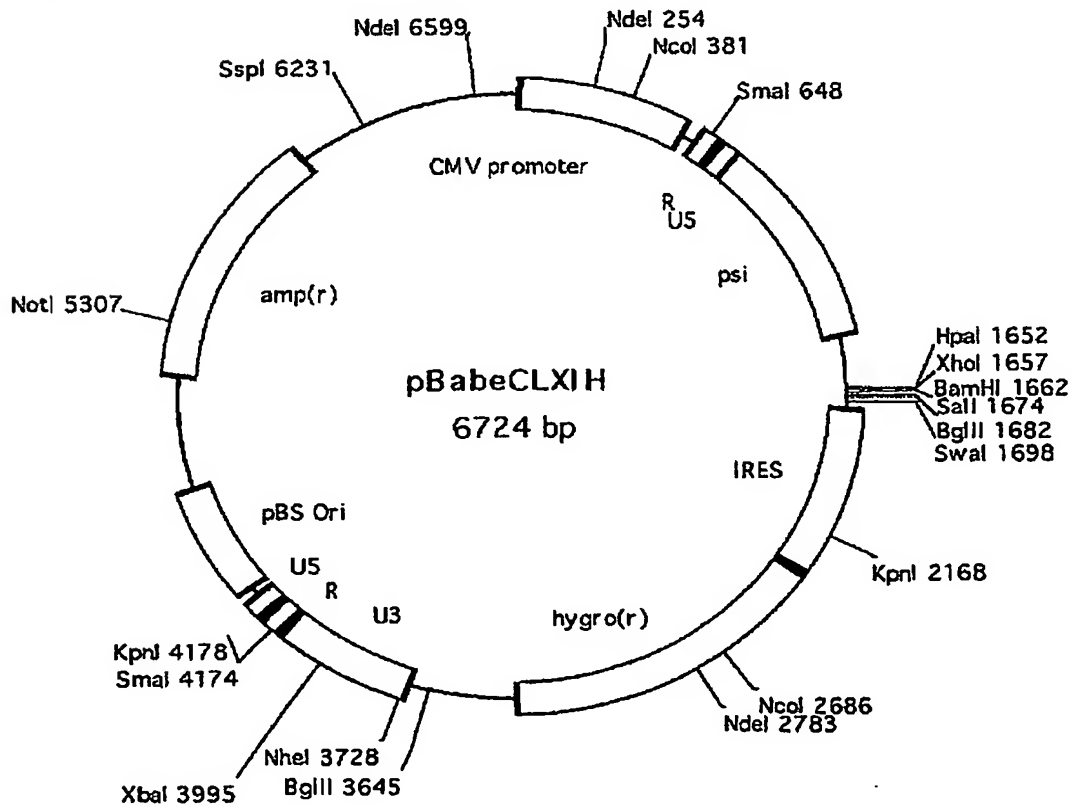
【図 2】



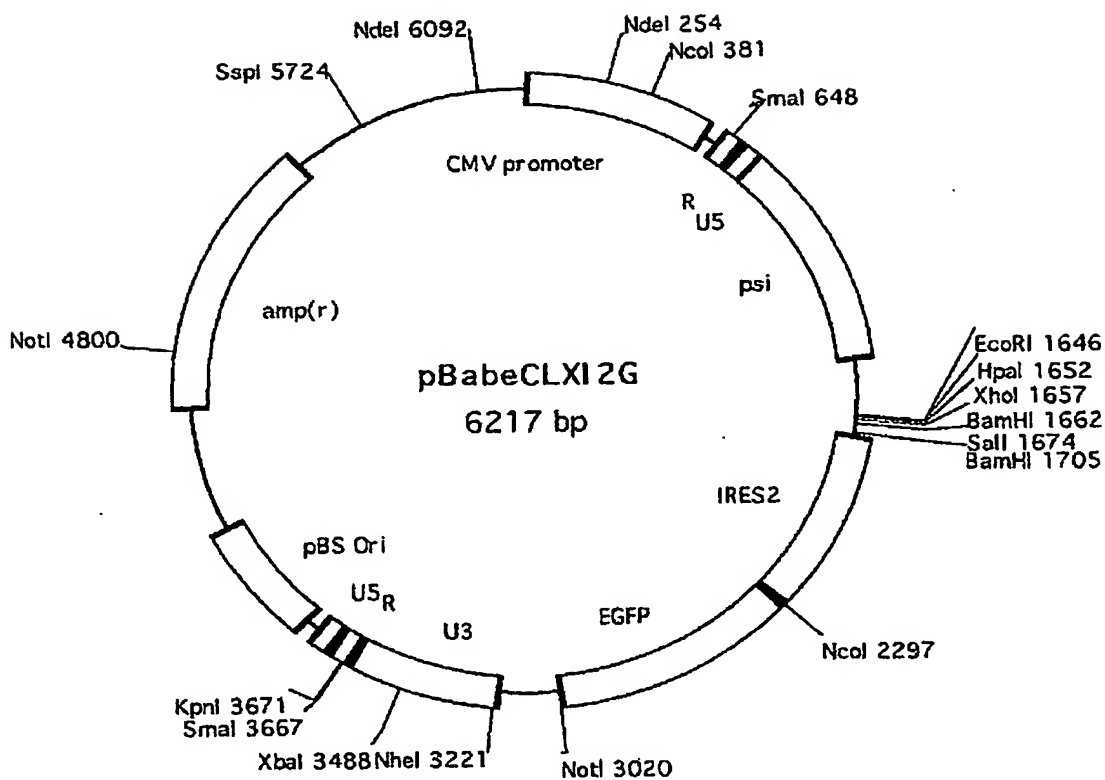
【図 3】



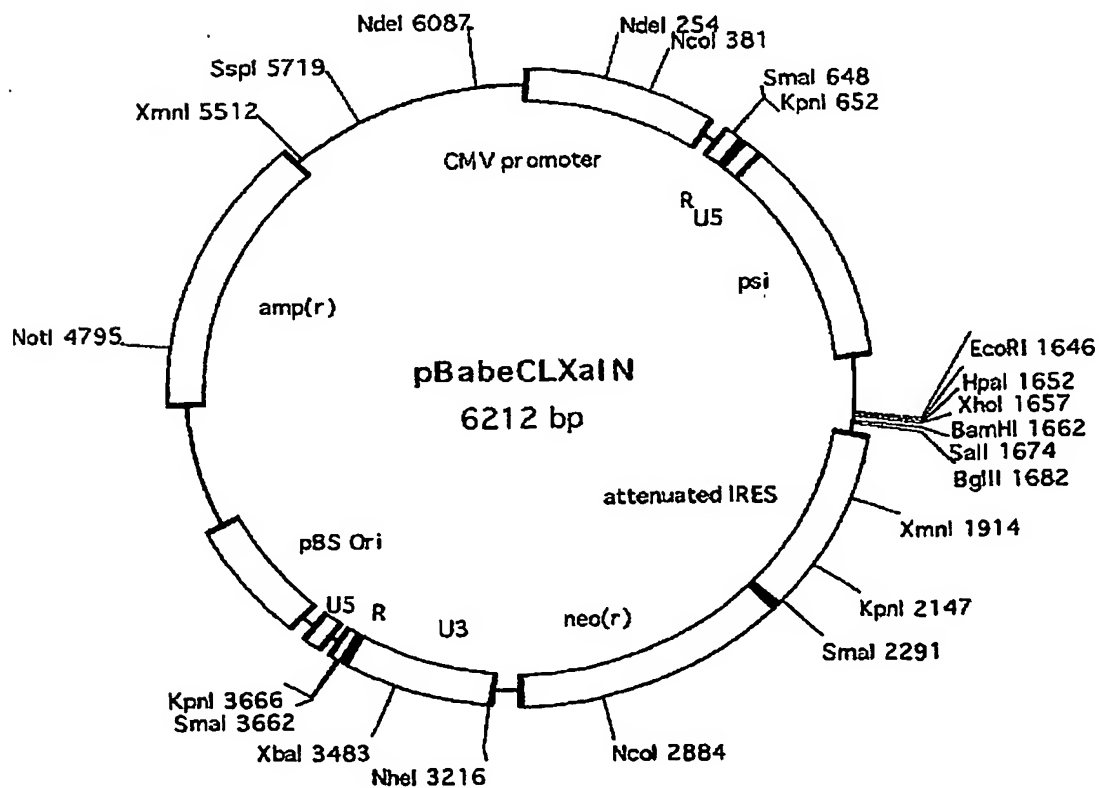
【図 4】



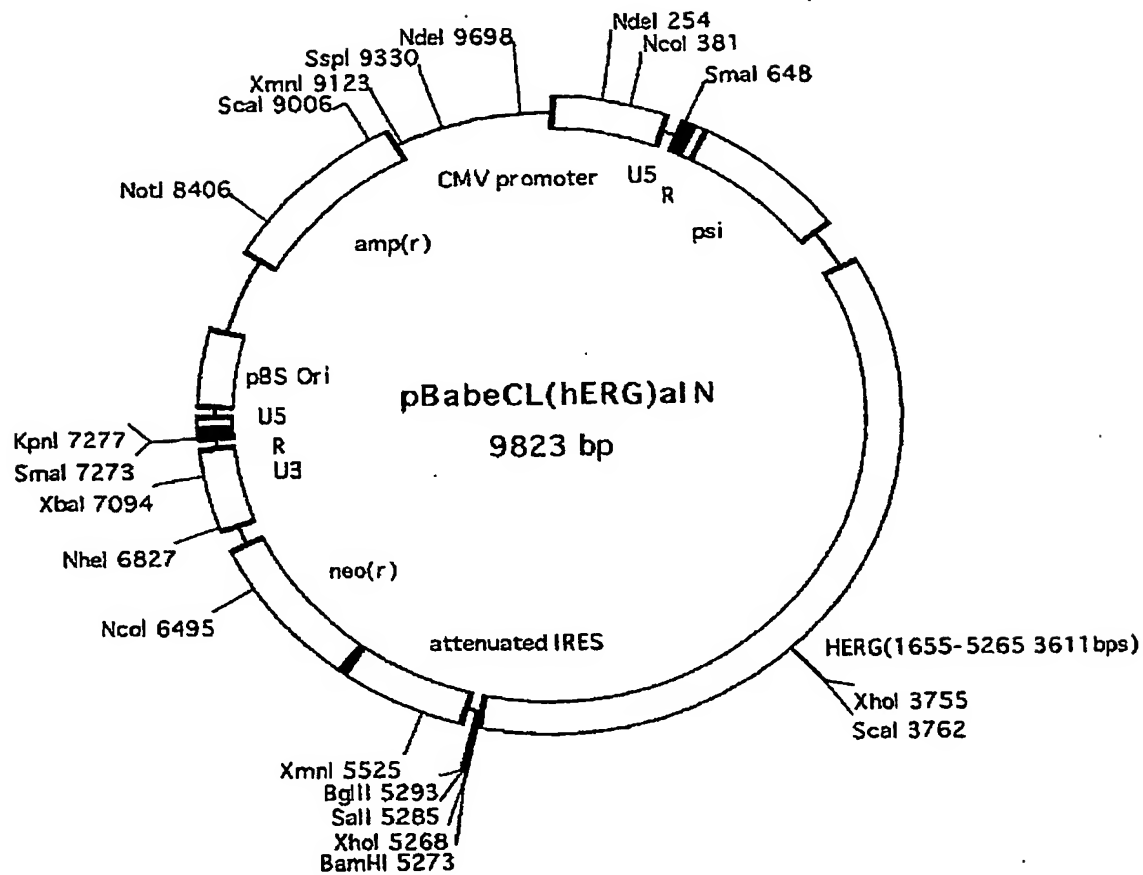
【図 5】



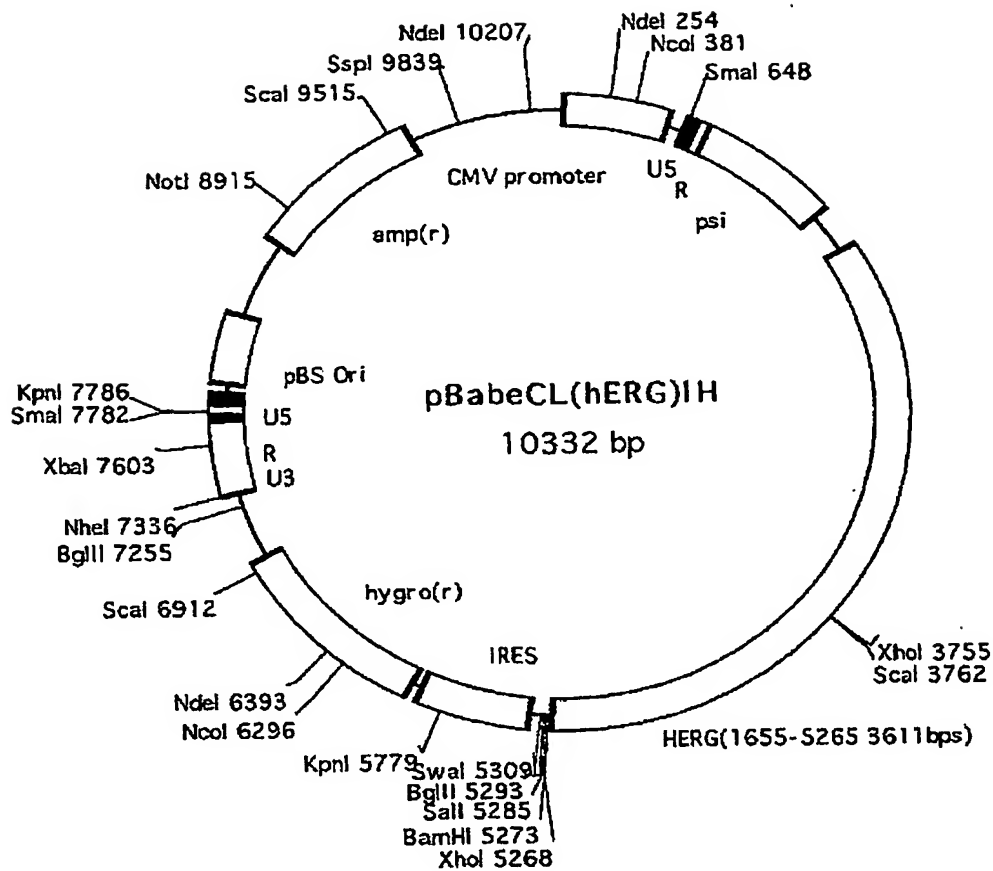
【図 6】



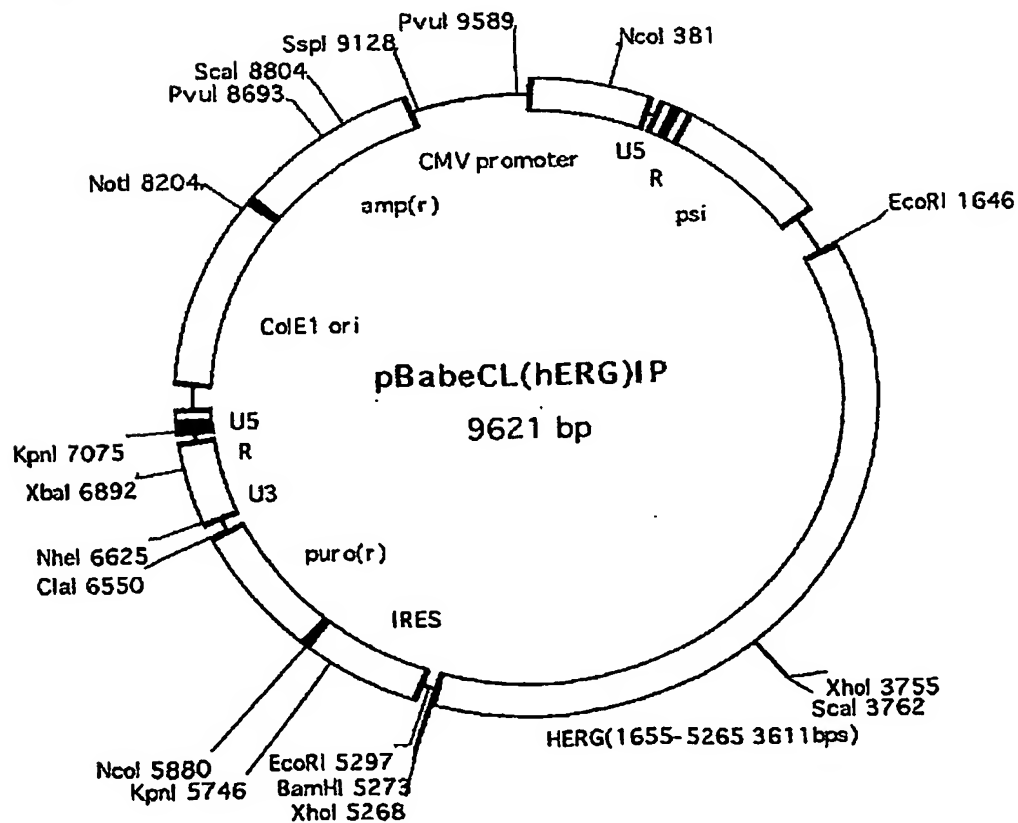
【図 7】



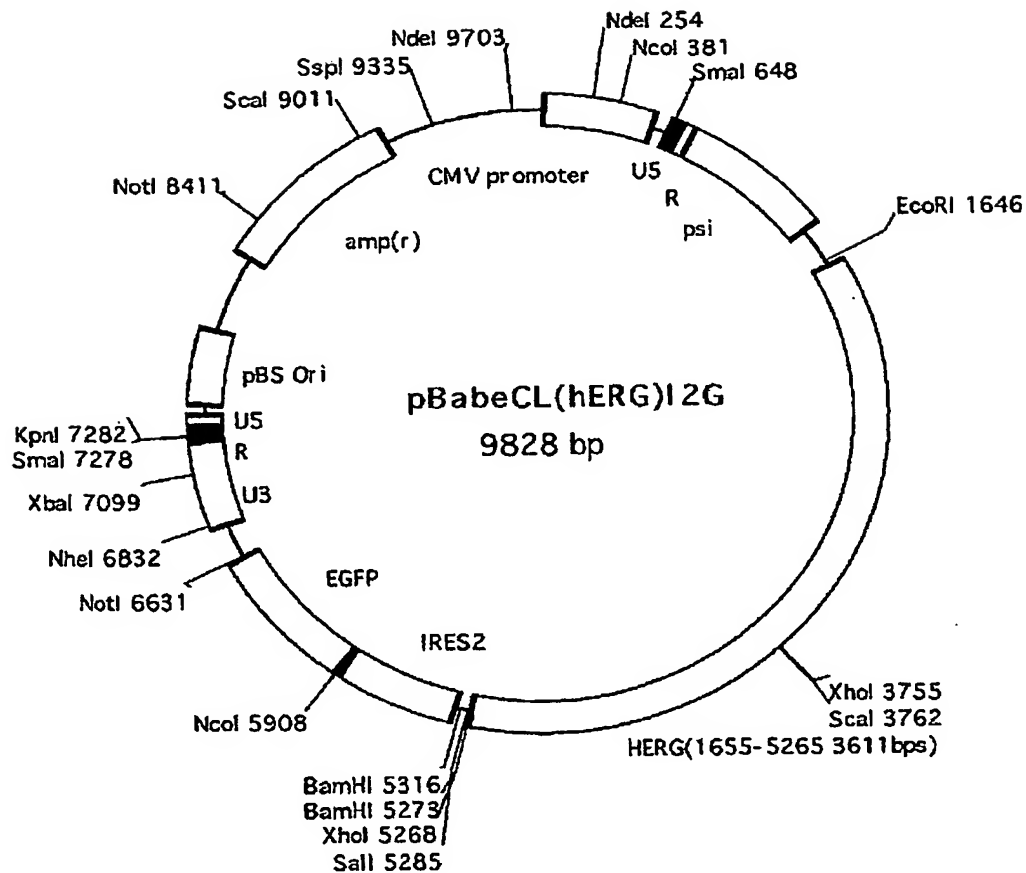
【図 8】



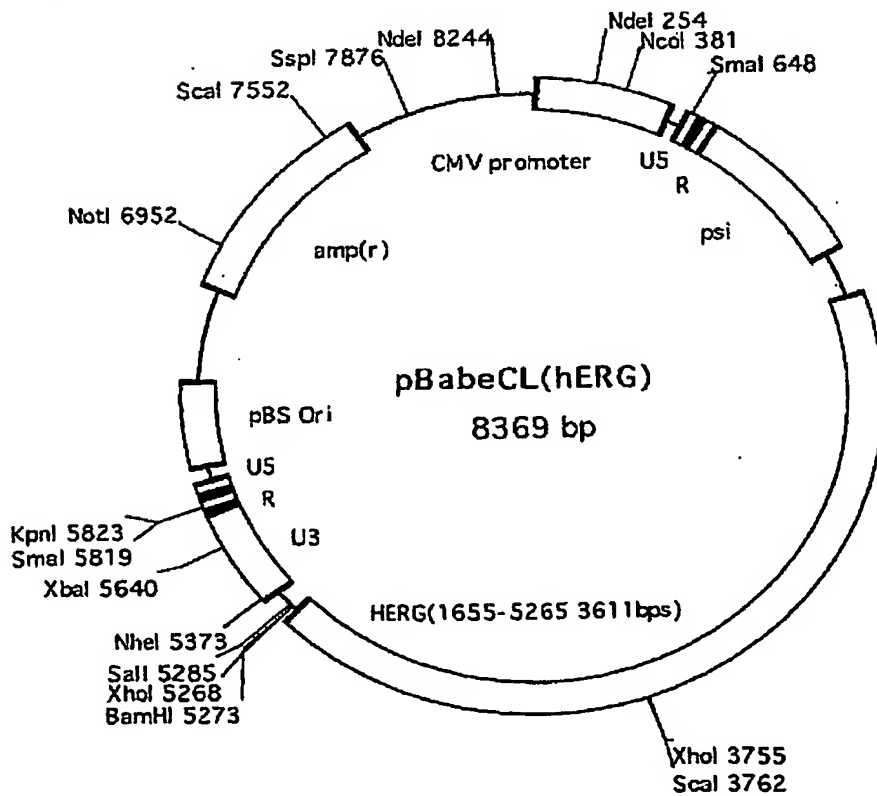
【図 9】



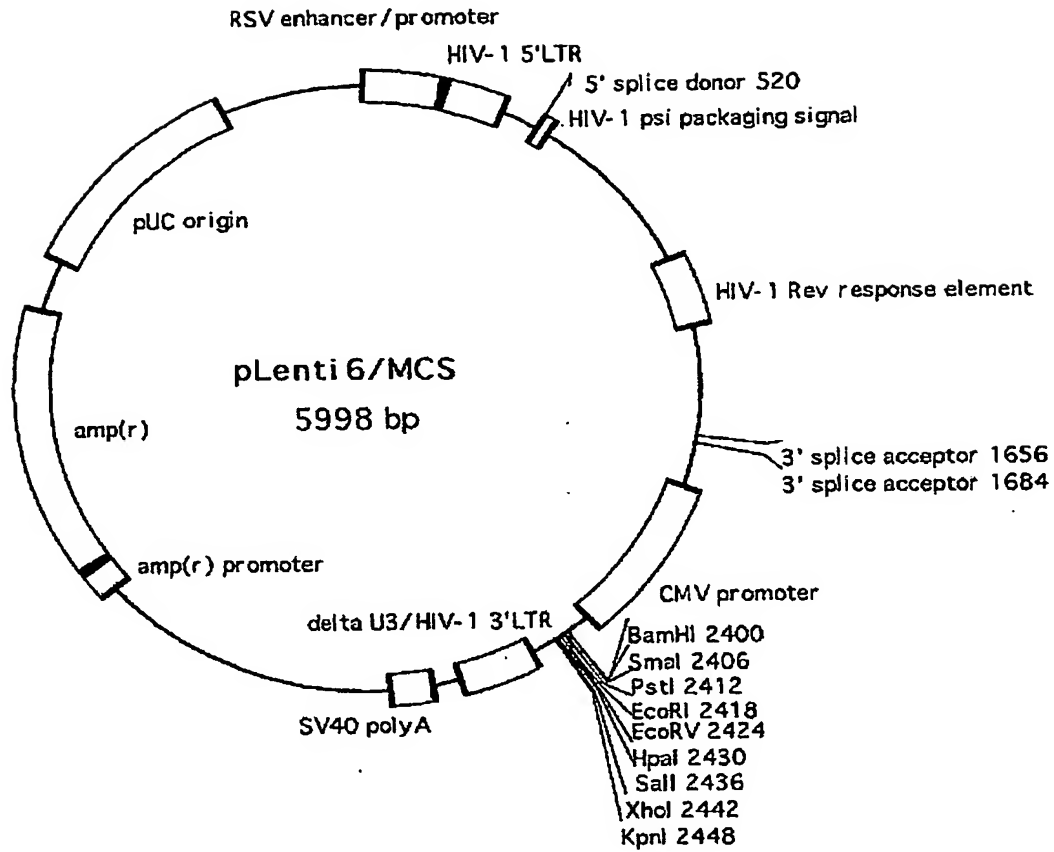
【図 10】



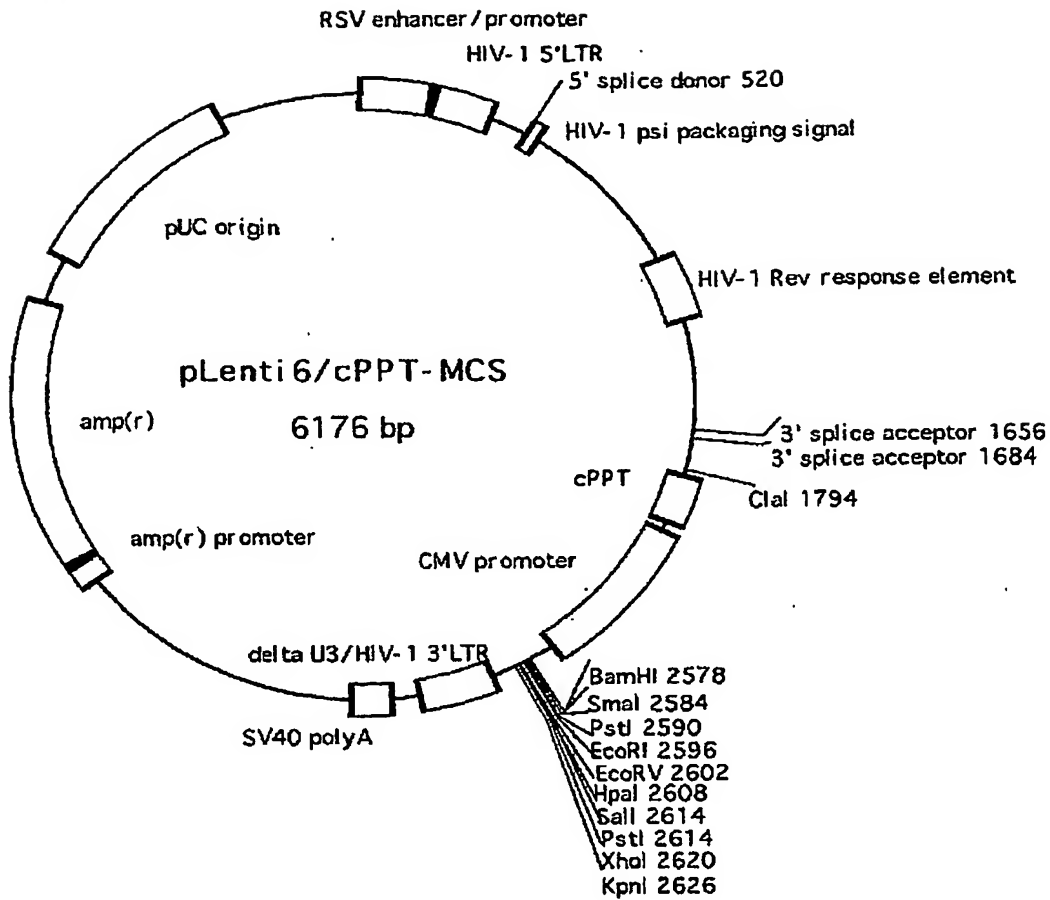
【図 11】



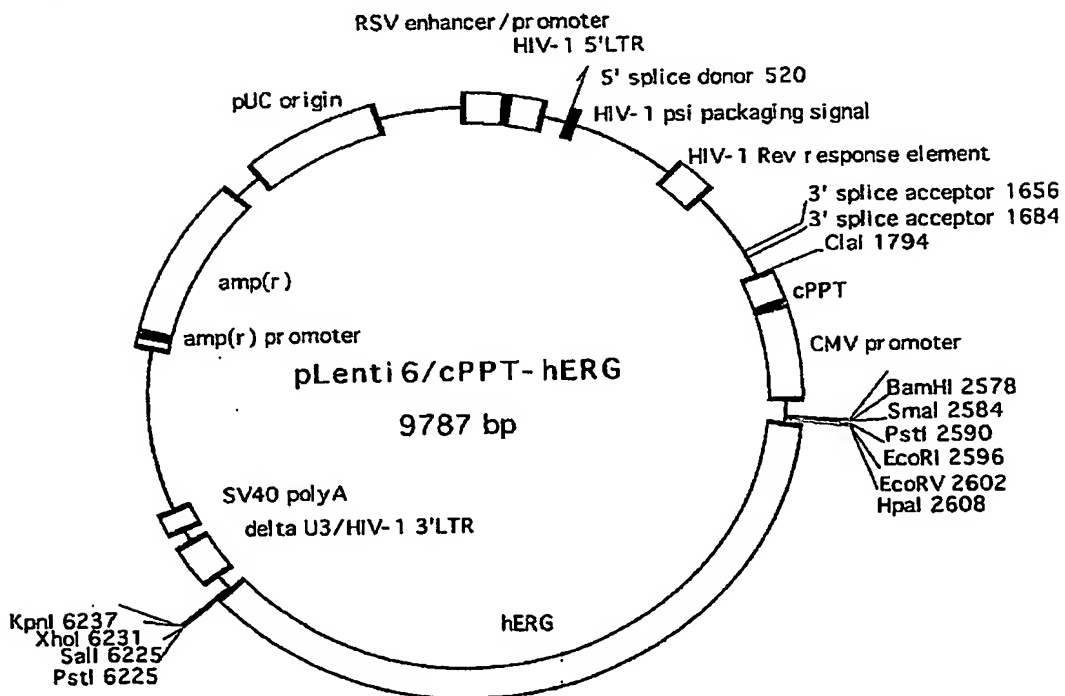
【図 12】



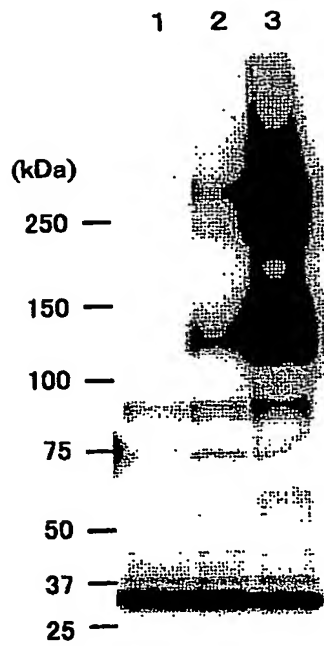
【図 13】



【図 14】



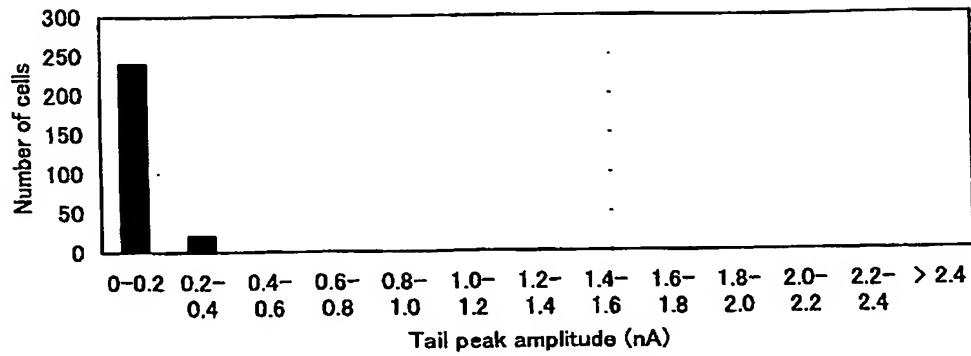
【図 15】



【図 16】

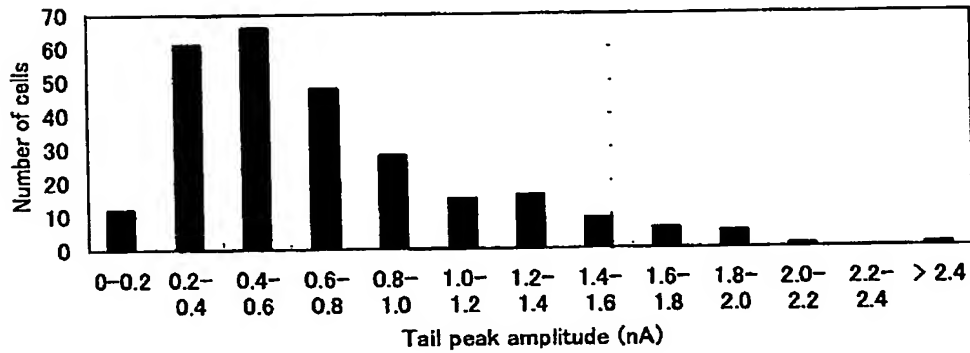
A

hERG Tail Current Frequency Distribution



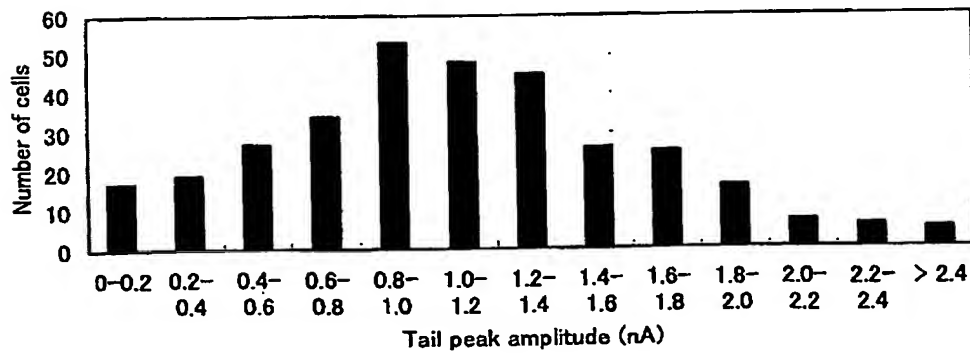
B

hERG Tail Current Frequency Distribution

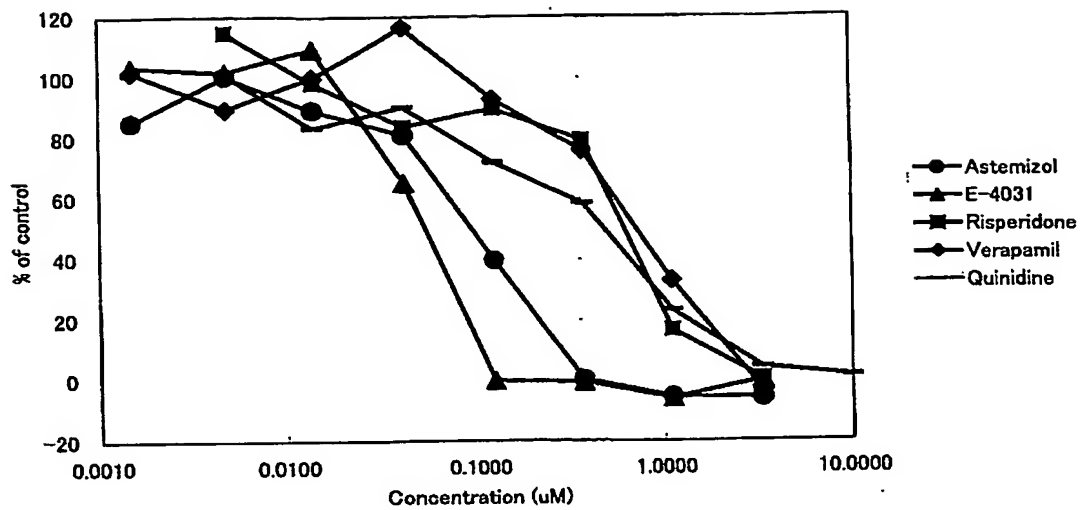


C

hERG Tail Current Frequency Distribution



【図 17】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明の課題は、薬剤研究開発におけるhERGチャネル阻害に基づく副作用を予測するための発現レベルの著しく高いhERGチャネル発現細胞の樹立法を確立し、それにより高感度・高処理能力を有する評価法を確立することにある。

【解決手段】 hERG遺伝子をレトロウイルスベクタープラスミドあるいはレンチウイルスベクタープラスミドに挿入し、ウイルスベクターを調製後、必要に応じて超遠心による濃縮を行い、細胞にhERG遺伝子を導入、hERGチャネルを発現させることにより、全自動ハイスループットパッチクランプシステムあるいは色素を用いた測定法においても有効な発現量を確保することが可能となった。

【選択図】 なし

特願 2003-387255

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000000217]

1. 変更年月日

1990年 8月29日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都文京区小石川4丁目6番10号

氏 名

エーザイ株式会社